

LA DETERMINATION
DE L'ACTIVITE AMYLASIQUE
DU SANG
ET DE L'URINE

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA METHODE AMYLOCLASTIQUE
DE SOMOGYI

THESE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

*présentée et soutenue publiquement
devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
de Lyon*

le 1^{er} Juin 1965

par

Gérard TROUYEZ

né le 7 Décembre 1929 à St-Galmier (Loire)



LYON
Imprimerie Sallaz
16, RUE BARODET

1965

LA DETERMINATION DE L'ACTIVITE AMYLASIQUE DU SANG ET DE L'URINE

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA METHODE AMYLOCLASTIQUE
DE SOMOGYI

THESE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

*présentée et soutenue publiquement
devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
de Lyon*

le 1^{er} Juin 1965

par

Gérard TROUYEZ

né le 7 Décembre 1929 à St-Galmier (Loire)



LYON
Imprimerie Sallaz
16, RUE BARODET

1965

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

DOYENS HONORAIRES

M. J. LEPINE, Membre de l'Institut — M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut

DOYEN : M. J.F. CIER

ASSESEURS : MM. M. LEVRAT - L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET, POLLOSSON.

PROFESSEURS

MM.		MM.	
CIBERT	Clinique Urologique	GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique	LATARJET	Anatomie
DECHAUME	Clinique Neuro-Psychiatrique et d'Hygiène mentale	PEYCELON	Pathologie chirurgicale
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie	GIRARD Marcel	Clinique médicale D
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale P	VACHON	Pathologie médicale
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B	GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	PAPILLON	Radiologie
CROIZAT	Clinique médicale C	JEUNE	Clinique médicale Infantile et Hygiène du premier Age
ENSELME	Chimie biologique et médicale ..	GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A	MONNET	Bactériologie
PIGEAUD	Pharmacie galénique	BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
BOURRET	Clinique Obstétricale	CHATONNET	Physiologie B
LEVRAT	Médecine du travail	GUINET	Clinique endocrinologique
SOHIER	Clinique médicale A	TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
	Hygiène et action sanitaire et sociale	FREIDEL	Clinique stomatologique
NETIEN	Botanique et cryptogamie	MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
BERTRAND	Chimie analytique pharmaceutique	DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
BADINAND	Pharmacie chimique et pharmacologie	DUMONT Louis	Histologie et embryologie
DREYON	Médecine légale et déontologie ..	PERRON	Chimie
ROCHE	Parasitologie et pathologie exotique	CIER J.F.	Physiologie A
COUDERT	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audio-Phonologie	PERRIN J.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
MOUNIER-KUHN	Clinique ophtalmologique	MICHAUD Pierre	Clinique de chirurgie cardiaque
PAUFIQUE	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie	SARROUY Charles	Clinique médicale infantile
THIERS	Clinique de pneumo-ptisiologie	X...	Clinique des maladies infectieuses
BRUN	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique	X...	Biologie médicale et pharmacodynamie
CREYSEL	Clinique carcinologique	X...	Clinique gynécologique
DARGENT	Anatomie pathologique	X...	Thérapeutique
GUICHARD			

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine	LEQUIRE	Neuro-chirurgie
BERTOYE	Bactériologie	REVOL	Médecine générale
MANSUY	Neuro-chirurgie	GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique	CIER André	Pharmacie Chimique et Pharmacologie
IACROIX	Hygiène et climatologie	PONT Maurice	Médecine générale
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique	TRAEGER	Médecine générale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

ROMAN	Parasitologie	DE SOLLIERS	Chimie analytique
FEROLDI	Anatomie pathologique	DESPIERRES	Médecine générale
MORET	Physique biologique	GARIN	Parasitologie
ODDOUX	Botanique et cryptogamie	TOLOT	Médecine du travail

MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES TITULAIRES

MM.			MM.	
GREYSEL	Roger	Chimie biologique	MICHEL	Anesthésiologie
THIVOLET		Hygiène	FRANÇOIS	Pédiatrie et puériculture
PINET		Electro-Radiologie	MICHOULIER	Chirurgie générale
GUYOTAT		Neuro-Psychiatrie	COLOMB	Dermatologie
DESCOTES		Chirurgie générale	LAMBERT	Médecine Générale
JOUVET		Pathologie expérimentale	FRIES	Médecine Générale
PEYRIN		Physique biologique	GILLY	Pédiatrie
TOMMASI		Anatomie pathologique	ROBERT	Médecine Générale
BUFFARD		Electro-Radiologie	BOUCHET	Anatomie
LEJEUNE		Médecine générale et thérapeutique	BETHENOD	Pédiatrie
			GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
DE MOURGUES F.		Stomatologie		Pneumo-phthisiologie
NAUSSAC		Maladies infectieuses	KALB	Pédiatrie
REBOUILLAT		Chirurgie générale	I ARBRE	Chirurgie Générale
ROMAGNY		Pédiatrie	SOUSTELLE	Médecine Générale
DELAHAYE		Médecine générale	VIALA	Bactériologie, parasitologie, virologie
DELEUZE		Anesthésiologie	VINCENT	Médecine Légale
GIRAUD		Electro-Radiologie diagnostic et thérapeutique	COLIN	

MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES STAGIAIRES

FAVRE-GILLY	Hématologie	FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie
GIROD	Histologie et embryologie	FLANDROIS	Physiologie
GRAS	Chimie biologique	VIALIER-RAYNARD	Bactériologie
MALLEIN	Chimie analytique	ROLLET	Pharmacie galénique
RIFFAT	Hygiène		

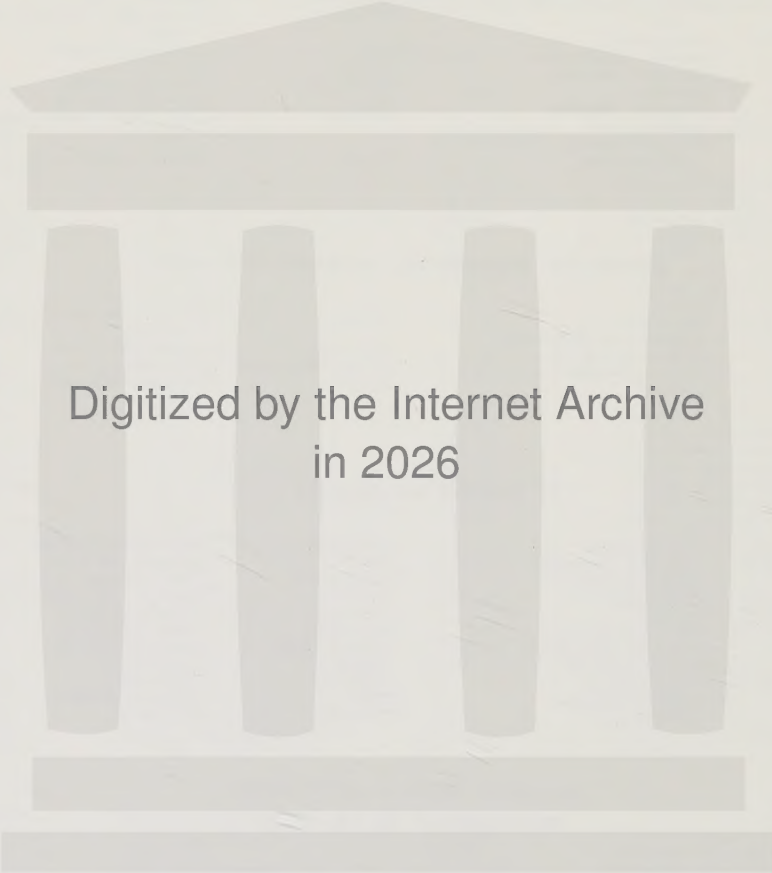
AGREGES EN EXERCICE

BONAMOUR	Ophthalmologie	GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
DE MOURGUES G.	Chirurgie générale	GARDE	Médecine générale
DEVIC	Médecine générale	HUGONNIER	Ophthalmologie
DUMONT Martial	Obstétrique	MARET	Chirurgie générale
DURAND	Urologie	MORNEX	Médecine générale
FRANCILLON	Chirurgie générale	NORMAND	Médecine générale
SAUBIER	Chirurgie générale	PERRIN André	Médecine générale
SCHOTT	Neuro-psychiatrie	DUMAS	Stomatologie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie	GARMIER	Obstétrique
CHASSARD	Electro-radiologie	NOEL	Médecine générale
FAYSSE	Orthopédie	SCHNEPP	Orthopédie

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Président : M. le Professeur J. DORCHE

Assesseurs : MM. A. BADINAND - A. BOUCHERLE - J. TRAEGER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MES FILLES

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

Monsieur le Professeur J. DORCHE

Pendant plusieurs semestres d'internat passés dans son service de l'Hôpital de la Croix-Rousse, nous avons pu apprécier les qualités du maître et de l'homme. Nous lui savons gré de l'aide que depuis, il nous a toujours apportée.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur A. BADINAND

Il a été notre maître à la faculté. Nous avons toujours trouvé auprès de lui un accueil bienveillant et nous le remercions de l'intérêt qu'il nous a porté en acceptant de nous juger.

Monsieur le Professeur A. BOUCHERLE

Nous avons apprécié son enseignement ainsi que sa courtoisie et sa gentillesse.

Nous le prions de bien vouloir trouver ici un témoignage de notre très sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur J. TRAEGER

Nous le remercions vivement de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de siéger parmi nos juges.

A Monsieur le Docteur Ch. MÉRIEUX

A Monsieur le Docteur P. DUBREUIL

Ils nous ont encouragé à entreprendre
ce travail et nous ont permis de le
mener à bien dans les Laboratoires de
l'Institut Mérieux.

Nous leur adressons nos très sincères
remerciements.

A TOUS CEUX QUI M'ONT AIDE
A REALISER CE TRAVAIL

A TOUS MES AMIS

LES AMYLASES

GÉNÉRALITÉS

1. — HISTORIQUE

Les propriétés, sinon la nature de l'amylase sont connues depuis fort longtemps. Cette recette relative à la « manière de faire la bière » trouvée dans un « Dictionnaire économique » [15] publié à Lyon en 1732, en fait foi :

« Les brasseurs ont coutume de donner un commencement de germination au grain qu'ils destinent à la composition de la bière ; ensuite, ils le font sécher, le moulent grossièrement pour le rendre propre à communiquer plus aisément sa substance à l'eau. Alors, il s'y mêle la fleur du houblon pour donner de la force et du goût à la bière ».

« Après cette préparation, ils ajoutent trois fois autant de grains non germés et moulus aussi grossièrement ; ils versent sur le tout l'eau à demi-bouillante et ensuite de la froide ; ou bien, ils font bouillir tous ces ingrédients dans l'eau ; ils y ajoutent autant de levure qu'il est nécessaire et agitent le tout longtemps à force de bras avec des instruments propres, le versant et le reversant dans différents vaisseaux pendant qu'il est chaud ».

L'importance économique et industrielle de cette enzyme explique que très tôt des chimistes éminents aient entrepris son étude.

En 1814, KIRCHOFF [44] constate que le grain de l'orge germé renferme une substance capable de liquéfier l'empois d'amidon, et de le transformer en jus sucré. Cette expérience est reprise une à deux années plus tard par DUBRUNFAUT qui remarque que ce « principe » saccharifiant est soluble dans l'eau et détruit par la chaleur.

On peut cependant considérer que PAYEN et PERSOZ [64] sont en 1832 les véritables « inventeurs » de l'amylase, et de ce fait, les précurseurs de l'enzymologie moderne.

Ils obtiennent le ferment en précipitant par l'alcool une macération de malt et constatent que la substance précipitée a la propriété de transformer l'amidon en sucres, et de séparer les enveloppes du grain de la substance amylacée se trouvant à l'intérieur. Se basant sur ce dernier fait, peu important mais spectaculaire, ils donnent à la substance qu'ils viennent d'obtenir le nom de diastase, du grec $\delta\iota\alpha\sigma\tau\alpha\delta\iota\delta$ qui signifie « qui sépare ». Ce terme quoique mal adapté, deviendra un nom générique qui désignera tous les produits du même type.

PAYEN et PERSOZ précisèrent en outre que cette diastase :

- était détruite par le chauffage à 100° ;
- était activée par le chauffage à 65° - 70° ;
- était spécifique d'un « substrat », l'amidon, et inactive vis-à-vis des autres substances, les protéines par exemple ;
- agissait à des doses minimales, sans rapport avec la quantité d'amidon à transformer et se comportait ainsi comme un véritable catalyseur biologique.

Ce faisant, ils définissaient les principales propriétés des ferments solubles et ouvraient la voie à de nouvelles découvertes qui allaient se succéder rapidement : la pepsine (BEAUMONT, SCHWANN 1836), l'émulsine (WOEHLER et LIEBIG 1837), la myosine (BUSSY 1839), la trypsine (KUHN 1848), la lipase (Cl. BERNARD 1849), l'invertine (BERTHELOT 1860), l'uréase (MUSCULUS 1876).

Entre temps, MAGENDIE (1846) avait mis en évidence l'amylase dans le sérum humain.

II. — LES SOURCES D'AMYLASE

L'amylase est une enzyme extrêmement répandue dans le monde vivant. On la rencontre aussi bien dans le règne végétal, que dans le règne animal. Nous citons ci-après quelques-unes de ces principales sources, de manière à montrer sa très grande diffusion.

— **Les bactéries** : De nombreuses bactéries possèdent une amylase. Sa présence chez certaines d'entre elles est un caractère constitutif permettant de différencier les espèces lors de l'analyse bactériologique. Certaines, telles *Bacillus orthobutylicus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus mesentericus* servent à la préparation de diastases industrielles (BOIDIN et EFFRONT) [25].

— **Les champignons inférieurs** : Les moisissures et en particulier celles du genre *Pénicillium* dont *Amylomyces rouxii*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor racemosus*, renferment de l'amylase, ou d'autres enzymes hydrolysant les dextrines. Certaines sont employées à des fins industrielles ou thérapeutiques.

Ces diastases d'origine fongiques ont été particulièrement étudiées par TAKAMINE (Takadiastase).

— **Les champignons supérieurs** : RUBIN et OBRUCHEVA [74] ont signalé de l'amylase chez les bolets.

— **Les végétaux** : L'amylase est extrêmement répandue chez les végétaux.

PAYEN et PERSONZ [64] en rencontrent dans toutes les graines de graminées en germination.

KJELDAHL et GREEN [47] montrent qu'on peut en trouver dans les nombreuses graines en dehors de la période de germination.

KOSSMANN et KRAUCH [48] la signalent dans les jeunes pousses et dans les feuilles, BARATNENSKY [5] dans les tubercules de pomme de terre au repos, BROWN et MORRIS [12] dans les embryons d'orge non germés.

— **Les animaux** : Chez les invertébrés, BOURQUELOT [11] a trouvé de l'amylase dans l'hépatopancréas des céphalopodes.

Les travaux concernant la présence de l'amylase, dans le sang, l'urine, la salive, ou les tissus de diverses espèces animales sont légion, et nous aurons l'occasion de revoir cette question dans le cours de ce travail.

III. — L'AMIDON - LES AMYLASES - RAPPELS BIOCHIMIQUES

Etant donné le caractère spécifique des réactions enzymatiques, il n'est pas possible d'évoquer l'enzyme, sans parler simultanément de son substrat. C'est pourquoi nous rappellerons les principales caractéristiques biochimiques de l'un et de l'autre dans ce chapitre.

A. — L'AMIDON

L'amidon, substance glucidique de réserve des végétaux, se présente en grains dont la forme peut varier suivant l'espèce botanique dont ils proviennent et permettre parfois de la caractériser.

Ces grains sont, dans la plupart des cas, constitués par plusieurs couches concentriques rangées autour d'un noyau : le hile. Ils sont biréfringents et donnent au microscope en lumière polarisée, le phénomène caractéristique de la croix noire.

A première vue, le grain d'amidon apparaît constitué par un noyau de matière amylacée et par un sac entourant ce noyau. Cette conception était celle des premiers observateurs, LEUWENHOEK [50] et BEIJERINCK [8] qui avaient décrit une méthode de coloration au tanin permettant de mettre en évidence l'enveloppe extérieure. Ces observations posaient le problème de l'homogénéité, ou de l'hétérogénéité de l'amidon. En fait, ainsi que l'écrit GRIGNARD [35] « la matière amylacée en tant que matière glucidique est homogène, son hétérogénéité apparente n'est que la conséquence de la répartition inégale des électrolytes qui l'accompagnent ».

Nous allons voir que la chimie moderne a permis de résoudre en grande partie ces problèmes qui en un temps avaient fait l'objet de très nombreuses discussions.

1) Propriétés physico-chimiques de l'amidon.

Le poids moléculaire de l'amidon est très différent suivant son origine botanique : Maïs : 77 000, Blé : 170 000.

L'amidon natif n'est pas soluble dans l'eau froide (après broyage, cependant, une partie importante peut entrer en solution), par contre il gonfle dans l'eau chaude pour donner un empois, qui est une solution colloïdale.

L'amidon, ou son empois, donne avec l'iode une coloration bleue caractéristique. Il faut noter, cependant, que cette coloration n'est pas spécifique de l'amidon et peut être obtenue avec d'autres substances, les saponines (BARGER et FIELD), des matières colorantes dérivées des flavones ou des pyrones (BARGER et STARLING). Le formol ou les alcools peuvent inhiber la formation de la coloration bleue.

2) Structure de l'amidon.

La formule brute de l'amidon est : $(C_6H_{10}O_5)_n$. Le coefficient « n » est variable dans des proportions assez considérables suivant l'origine de l'amidon.

Le grain d'amidon est formé essentiellement de matière amylacée, mais contient également en faible quantité des constituants non glucidiques.

a) Les constituants non glucidiques.

Ces composés, présents en faible quantité, font, cependant, partie intégrante de la molécule, car si on les élimine, les propriétés du produit initial se trouvent considérablement modifiées.

On y rencontre l'acide phosphorique et l'acide silicique qui estérifieraient certaines fonctions alcools libres de l'amidon.

— Dans certains amidons (pomme de terre), il existe des cations : Mg^{++} et K^+ qui équilibrent les fonctions acides non estérifiées de l'acide phosphorique.

— L'azote est présent dans l'amidon de blé par exemple, sous forme de groupements phosphatidiques.

— Enfin, on a pu isoler certains acides gras (maïs).

b) La partie glucidique.

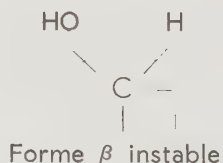
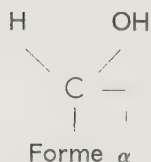
L'analyse physico-chimique a permis de démontrer que la partie glucidique de l'amidon était constituée d'un polymère de monosaccharides liés entre eux, avec élimination d'eau, en chaînes linéaires ou ramifiées (chaque molécule d'amidon ne contient qu'un groupement réducteur libre).

— La composition de ce polysaccharide a été étudiée par l'analyse qualitative et quantitative des sucres libérés sous l'influence des acides.

— La polarimétrie, la méthylation, l'oxydation périodique et la diffraction aux rayons X ont permis de préciser les modes de liaison et de déterminer les fonctions alcools libres.

— On a pu, par dégradation enzymatique, déterminer les différents types de branchements et isoler les produits intermédiaires de dégradation.

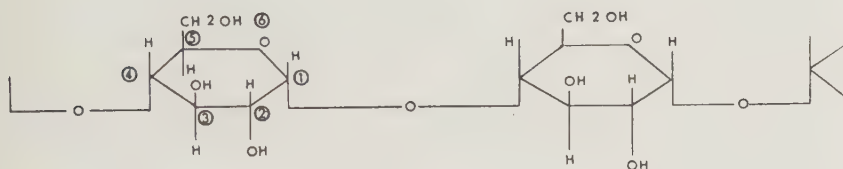
Par action de l'acide sulfurique 1 à 2 N à 100° pendant une heure, on obtient une hydrolyse totale, conduisant à la formation de glucose. Cette transformation est quantitative et peut être mise à profit pour titrer l'amidon. Le glucose formé se trouve sous la forme de glucopyranose α , c'est-à-dire que le pont oxydique se trouve situé entre le carbone 1 et le carbone 5, et que d'autre part, il s'agit de la forme α (position de l'oxyhydrile terminal du C_1 par rapport au C_2).



Ces molécules de glucose peuvent donc être réunies entre elles par les carbones 1, 2, 3, 4 et 6.

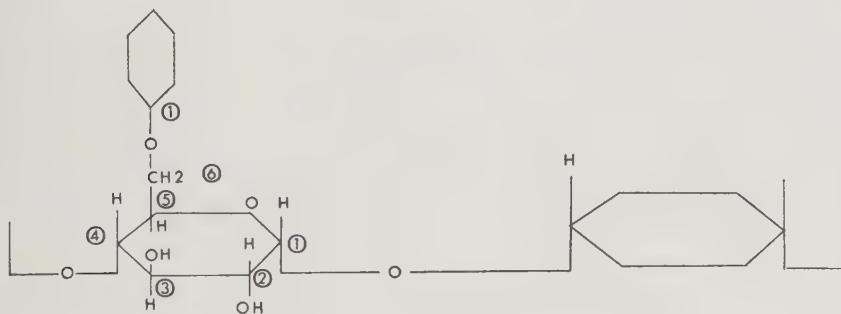
Le carbone 1 (groupement réducteur) est bloqué avec certitude puisque la molécule d'amidon ne renferme qu'un seul groupement réducteur libre.

Ce carbone 1 est relié au carbone 4 du glucose voisin, avec élimination d'eau, ce qui conduit à la formation de chaînes où les liaisons se font toujours entre les C_1 et les C_4 (MEYER, FREUDENBERG) [57].



C'est la formule linéaire de l'amidon appelée encore amylose ou α amylose.

Il existe également un second type d'amidon dit « ramifié » ou amylopectine ou isoamylose dans lequel on rencontre sur les chaînes formées par la liaison des carbones 1 et 4, des ramifications au niveau du carbone 6, sur l'oxhydrile de l'alcool primaire.



L'existence de ces ramifications a pu être établie par l'action d'acides très dilués qui ont permis d'isoler du 6 (α D glucopyranosyl) D glucose ou isomaltose.

Les chaînes linéaires revêtent probablement une forme spiralée, tandis que l'amylopectine présenterait une molécule très globuleuse et condensée.

En conclusion, l'amidon apparaît donc comme un polysaccharide formé de chaînes de glucose reliées, soit sous forme linéaire par les carbones 1 et 4, soit sous forme ramifiée par les carbones 1 et 4 et de temps en temps par les carbones 1 et 6. Ces deux formes coexistent d'ailleurs dans un même grain d'amidon, et sont probablement liées par des liaisons hydrogènes. La connaissance de cette structure permettra de comprendre plus aisément l'action de l'amylase.

Cependant, d'après SUTRA et DUMAZERT [84], la molécule d'amidon serait encore plus complexe et consisterait en un polymère de polymère de formule brute.



Pour ces auteurs, amylose et amylopectine seraient déjà des produits de dégradation.

3) Caractéristiques des différents types botaniques d'amidon.

Les grains d'amidon provenant de diverses espèces végétales présentent une morphologie particulière qui permet de les différencier au microscope. On trouve également des différences au point de vue chimique, tant dans la composition et la teneur en éléments non glucidiques, que dans la composition de la substance amylacée. Ce sont surtout ces dernières qui présentent un intérêt pour le dosage de l'amylase.

D'après J. AGNERAY [1], les proportions d'amylose et d'amylopectine dans les amidons les plus couramment utilisés seraient les suivantes :

Amidon de blé	}	amylopectine	80 %
Fécule de pomme de terre		amylose	20 %
Amidon de maïs	}	amylopectine	94 %
Amidon de riz		amylose	2 à 3 %
Amidon d'orge			

Ces différences de composition pourraient être à la base d'un choix quant à la nature de l'amidon à utiliser pour le dosage de l'amylase. A priori, il paraîtrait plus logique d'employer un amidon du type maïs, constitué presque exclusivement par de l'amylopectine et par conséquent plus homogène. C'est cette solution que préconise SOMOGYI [83] qui admet cependant que d'autres amidons riches en amylopectine, tels la « Ramalin » (fraction amylopectique de l'amidon de pomme de terre), puissent être utilisés.

Tous les auteurs cependant, ne partagent pas cette opinion et J. AGNERAY [1] estime que le choix de l'amidon « est surtout fondé sur des habitudes locales, l'amidon de blé et la fécule de pomme de terre étant préférés en France, et l'amidon de maïs dans les pays anglo-saxons ». La différence de structure des substrats ne permettrait pas « de déduire des constatations analytiques intéressantes ».

4) Les amidons solubles.

Les amidons solubles étant très fréquemment cités à propos du dosage de l'amylase, il nous a paru utile de décrire les types les plus connus.

On désigne sous le nom d'amidons solubles, des amidons qui ont la propriété de se disperser dans l'eau sans former d'empois. Ces amidons ont de nombreuses applications analytiques (substrat, indicateur) ou industrielles.

— Amidon soluble de Wolff-Fernbach [95].

Il est préparé à partir de la fécule de pomme de terre, qui est d'abord lavée avec de l'eau distillée, puis agitée avec de l'acide chlorhydrique à 1 % environ. La solution acide est décantée, et l'amidon soigneusement lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que les eaux de lavage soient neutres. Cet amidon chauffé aux environs de 40° devient soluble et donne **dans l'eau bouillante** des solutions limpides.

— Amidon soluble de Lintner [51].

Très employé dans les pays anglo-saxons, il est préparé de la manière suivante : la fécule de pomme de terre est mise en contact avec de l'acide chlorhydrique normal (23 g de fécule pour 1 litre d'acide) pendant deux semaines. La solution acide est alors décantée, et l'amidon lavé à l'eau distillée est mis à sécher à l'air libre. L'amidon obtenu est soluble **dans l'eau bouillante**.

— Amidon soluble de Zulkowsky [100].

La fécule mise en suspension dans du glycérol est chauffée à 190°. On ajoute ensuite de l'alcool éthylique à 96° qui la fait précipiter. Le précipité est lavé par l'alcool et l'éther puis desséché sous vide. Cet amidon présente l'avantage d'être soluble **dans l'eau froide**. D'après ZIESE, il serait à peu près totalement exempt de phosphore.

— Amidon soluble de Leulier [49].

L'amidon est porté à l'ébullition pendant 15 minutes dans de l'alcool à 95° renfermant 5 % d'acide sulfurique (25 g d'amidon pour 100 g du mélange). On le recueille alors sur un filtre, puis on le lave à l'eau ou à l'alcool jusqu'à réaction neutre des liquides de lavage. Cet amidon est soluble **dans l'eau bouillante**.

Les amidons solubles qui offrent une certaine facilité d'emploi, sont cependant généralement déconseillés pour le dosage de l'amylase, car ils peuvent être partiellement dénaturés, et de qualité variable d'un lot de fabrication à un autre. SOMOGYI [83], qui dit avoir utilisé un amidon de LINTNER donnant d'emblée avec l'iode, la coloration des érythrodes, est formel à cet égard.

B. — LES AMYLASES

Nous avons vu que les sources d'amylases sont extrêmement variées. Quelle que soit leur origine, les amylases présentent deux caractères communs, celui d'être des protéines, et celui d'hydrolyser l'amidon.

Elles possèdent en tant que protéines tous les caractères physico-chimiques de ces dernières. Elles coagulent par la chaleur. L'acide trichloracétique et les autres agents déféquants, les précipitent en les dénaturant. Le sulfate d'ammoniaque, l'alcool, l'acétone les précipitent également, mais sans les dénaturer, dans des conditions expérimentales satisfaisantes. Elles sont solubles dans l'eau et les solutions salines diluées. Elles ne sont pas dialysables. Elles donnent une coloration avec le réactif de Millon et présentent un maximum d'absorption à 280 m μ .

La composition chimique des amylases n'est pas exactement connue, mais on sait qu'elle varie d'un type à un autre. En effet, leur poids moléculaire, leur composition en acides aminés, leur vitesse de migration à l'électrophorèse sont différents. Ceci reste vrai dans le groupe restreint des amylases sériques humaines, que nous étudierons de manière plus précise.

Toutes les amylases hydrolysent l'amidon, mais le mode d'attaque peut être différent de l'une à l'autre :

1) **Mode d'action des amylases sur l'amidon : α et β amylases.**

L'action des amylases sur l'empois se manifeste par trois phénomènes essentiels :

- une action liquéfiante,
- la formation de dextrines,
- l'apparition de sucres réducteurs.

a) Action liquéfiante.

L'empois devient plus fluide. Il s'agit vraisemblablement d'un début d'hydrolyse, mais les différences chimiques entre cet amidon modifié et l'amidon de départ ne sont pas nettes.

b) Action dextrinante, ou dextrinogène, ou amyloclastique.

La coloration bleue provoquée par l'addition d'iode à l'empois varie peu à peu pour faire place successivement à des colorations

violettes, rouges et brunes, puis pour disparaître complètement. On appelle erythrodextrines, les dextrines qui donnent une coloration rouge avec l'iode, achrodextrines les molécules plus petites qui ne sont plus colorées.

c) Action saccharifiante ou saccharogénique.

Au fur et à mesure de l'hydrolyse enzymatique, on voit augmenter le pouvoir réducteur de l'empois. Cette augmentation est due essentiellement à la formation de maltose, mais aussi à celle de glucose et de polysaccharides.

La quantité de sucres réducteurs formés aux dépens de l'amidon, ainsi que leur vitesse d'apparition, varient beaucoup suivant les conditions d'hydrolyse.

— Avec les chaînes d'amylose, la transformation est pratiquement quantitative.

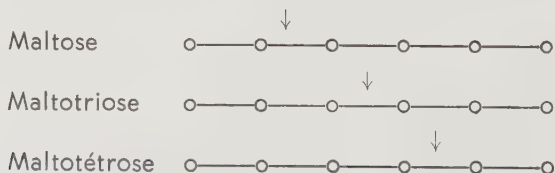
— Avec l'amylopectine, la quantité de sucres formés n'est jamais quantitative.

En se basant sur ces faits, on a pu voir que le mode d'attaque de l'amidon était différent suivant la nature de l'amylase, et on a pu distinguer deux types essentiels : la β amylase ou saccharogène amylase, l' α amylase ou dextrinogène amylase.

Ces deux types d'enzyme qui coupent les chaînes d'amidon au niveau des liaisons 1-4, et laissent intactes les liaisons 1-6 (ce qui explique la transformation non quantitative de l'amylopectine) agissent cependant de manière différente.

— Mode d'action de la β amylase.

La β amylase attaque la molécule d'amidon à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne. Elle transforme d'abord l'amylose en maltotétrose et en maltotriose.



Le maltotriose est ensuite lentement hydrolysé en glucose et en maltose (WHELAN et ROBERTS) [92].

La β amylase seule ne transforme que 70 % de l'amylose en maltose. Avec l'amylopectine, on n'obtient que 40 % de maltose, l'hydrolyse étant bloquée au niveau des liaisons 1-6 ; on verra plus loin que pour que l'hydrolyse puisse continuer, un autre enzyme, le Z enzyme, doit intervenir.

— Mode d'action de l' α amylase.

L' α amylase donne rapidement à partir de l'empois d'amidon, des dextrans de faible poids moléculaire, qui sont ensuite, dans un deuxième temps, transformées lentement en sucres réducteurs dont les principaux sont le maltose et le maltotriose.

Le point d'attaque de l' α amylase est donc plus éloigné de l'extrémité de la chaîne. Les liaisons 1-6 ne sont pas touchées, mais ne constituent pas un obstacle à son action, car l'hydrolyse se fait de la même façon avec l'amylose ou l'amylopectine. L'influence des ramifications se fait toutefois sentir dans le deuxième temps de l'action diastasique, car seules les amyloses peuvent subir une saccharification presque totale.

2) Principales caractéristiques des amylases.

— La β amylase.

On a considéré pendant longtemps qu'elle n'existait, ni chez les animaux, ni chez les micro-organismes. Cependant, THAYER [85] en a trouvé chez les bactéries, et GUY et JENNERS [38] dans le lait. On l'obtient généralement à partir des patates douces et de l'orge germé. Elle est stable à pH acide, mais est rapidement détruite par une température élevée (MEYER, SPAHR et FISCHER) [58].

— L' α amylase.

Se trouve surtout dans les tissus animaux, mais se rencontre également dans les bactéries, les moisissures, les grains germés. On

peut l'obtenir purifiée à partir du pancréas, de certains *aspergillus* ou de l'orge germé. Elle est stable à la chaleur, détruite ou inactivée à pH acide.

L' α et la β amylase sont les deux principales diastases hydrolysant l'amidon. Lorsqu'elles sont associées, la dégradation de l'amidon est plus rapide, car l' α amylase supprime les obstacles s'opposant à l'action de la β amylase, qui peut alors attaquer les dextrines. Leur caractéristique essentielle est de produire du maltose à partir de l'amidon, ceci sans toucher aux liaisons 1-6 de l'amylopectine.

α et β amylases ne sont pas les seuls ferments capables de dégrader l'amidon en produisant des dextrines, ou des sucres réducteurs. Il en existe d'autres qu'il est important de connaître, car leur action peut venir se surajouter à celle de ces deux ferments de manière fortuite (contamination bactérienne) ou permanente (présence dans les tissus animaux).

— La glucamylase.

Possède une action analogue à celle de la β amylase, en ce sens qu'elle attaque le polysaccharide au niveau des liaisons 1-4 et à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne. Par contre, il y a formation directe de glucose et pas d'étapes intermédiaires (dextrines, maltose).

Elle se rencontre chez les moisissures et les levures : *Rhizopus delemar*, et *Aspergillus niger* (TSUJISAKA et Coll.) [86], *Saccharomyces diastasicus* (HOPKINS et KULKA) [41].

— La γ amylase.

Hydrolyse l'amidon au niveau des liaisons 1-4 en donnant du glucose et du maltose. On la rencontre chez *Aspergillus awamori* (KITAHARA et Coll.) [46].

— La *Bacillus macerans* amylase.

Attaque l'amidon au niveau des liaisons 1-4 en donnant des dextrines de poids moléculaire assez élevé. Se rencontre uniquement dans les filtrats du *Bacillus macerans*.

— **Le R enzyme.**

Agit sur les liaisons 1-6 des chaînes d'amylopectine, et des produits de dégradation obtenus par l'action de la β amylase sur l'amylopectine. Par ce fait, il permet l'action complète de la β amylase avec formation de maltose, même à partir de l'amylopectine.

On le rencontre dans les pommes de terre et dans les levures (*Saccharomyces diastasicus*).

— **Le Z enzyme.**

L'action de cet enzyme s'ajoute à celle de la β amylase.

Amylose + β amylase $\rightarrow$ 70 % de maltose.

Amylose + β amylase + Z enzyme $\rightarrow$ 100 % de maltose.

Son mode d'action n'est pas exactement connu. On sait cependant qu'il n'intervient pas sur les liaisons 1-4, sur les liaison 1-6, ou sur 1-3. On a pensé que son action était analogue à celle d'une β glucosidase, bien que des travaux récents tendent à prouver le contraire (COWIE et Coll.) [19].

On le rencontre dans les graines de soja et d'une manière générale dans tous les végétaux renfermant de la β amylase dont il est le contaminant habituel.

— **L'amylo 1-6 glucosidase.**

Agit en coupant les liaisons 1-6 des dextrines formées à partir de l'amylopectine. Est sans action sur l'amylopectine elle-même.

On la trouve dans le tissu musculaire.

— **L'oligo 1-6 glucosidase.**

Agit sur les liaisons 1-6 des dextrines obtenues après hydrolyse de l'amylopectine par l' α amylase. On la rencontre dans la muqueuse intestinale.

— L'isoamylase.

A été d'abord confondue avec le R enzyme, car son action est analogue, mais elle ne touche pas l'isomaltose, alors que le R enzyme le transforme en glucose.

*
**

D'autres enzymes ont été décrits, mais dans la plupart des cas, il s'agissait de mélanges d'enzymes susceptibles de détruire les molécules d'amidon, mais par des processus différents. Nous citerons, pour exemple :

— Le P enzyme.

C'est une phosphorylase. En présence de phosphates, l'amylose, l'amylopectine, les dextrines peuvent être dégradées avec production de D glucose (WHELAN et BAILEY) [91].

On rencontre le P enzyme dans le règne végétal, principalement dans les tubercules de pomme de terre et dans certaines espèces de graminées et de légumineuses.

— La glycogène phosphorylase.

Cette phosphorylase catalyse la synthèse et la dégradation des molécules type amylose par « transglucosylation » à partir de α D glucosylphosphate. Cette enzyme, dont dépend en grande partie le métabolisme du glycogène dans les cellules animales, peut dégrader partiellement, en présence de phosphates minéraux, l'amylopectine et l'amylose en glucose 1-6 phosphate (HESTRINS) [39]. Ce fait vu sous l'angle du dosage de l'amylase en clinique, peut avoir de l'importance.

Cette longue énumération a pour but de montrer la complexité du problème de la dégradation de l'amidon par les enzymes. Elle indique qu'une technique de dosage de l'amylase mise au point pour un liquide biologique donné appartenant à une espèce animale définie, ne doit être extrapolée à un autre liquide biologique, ou à une autre

espèce animale, qu'avec une extrême prudence. SOMOGYI [83] en donne un exemple, lorsqu'il écrit à propos du coefficient qu'il utilise pour sa méthode amyloclastique « it does not apply to media that contain, in addition to amylase, other saccharogenic enzymes - for instance phosphorylase ».

Par ailleurs, la très grande diffusion des ferments amylolytiques chez les bactéries et les moisissures, démontre que tout dosage d'amylase effectué sur un prélèvement contaminé (et ceci peut être le cas pour les urines) est sujet à caution.

3) Conditions d'action de l' α amylase : inhibiteurs, activateurs.

L'activité des enzymes est soumise à l'influence d'éléments activateurs ou inhibiteurs susceptibles de modifier leur action. Ces éléments, différents pour chaque ferment, varient également pour des enzymes aussi voisins que le sont les α et β amylases.

Nous étudierons uniquement les conditions d'action de l' α amylase, qui seule, présente un intérêt clinique. Il faut cependant noter que suivant l'origine de l' α amylase, ces conditions peuvent varier, par exemple : pour une α amylase provenant d'un pancréas humain, le pH optimum n'est pas le même que pour une α amylase provenant de l'orge.

a) Rapport entre les concentrations d'enzyme et de substrat.

La vitesse de réaction de l' α amylase est régie par la loi d'action

$$\text{de masse } K = \frac{1}{t} \log \left(\frac{a}{a - x} \right) \text{ où « } x \text{ » est la quantité de substrat}$$

de concentration initiale « a » hydrolysée au temps « t ». Il en découle que la quantité de substrat à mettre en œuvre, dépend de celle qui est hydrolysée en un temps donné. On considère en général que cette quantité doit être telle que les enzymes les plus actifs n'en hydrolysent pas plus de 15 à 20 %.

Dans le cas de l' α amylase, pour plus de sécurité, on veille à ce que la quantité de substrat hydrolysé ne dépasse par 5 %. Ceci présente un avantage, car avec un faible pourcentage d'hydrolyse, les produits de la réaction diastasique (glucose, maltose) qui agissent comme inhibiteurs seront présents en petite quantité.

b) Le pH.

En étudiant les relations qui existent entre l'activité enzymatique et le pH du milieu, on trouve deux valeurs limites au-delà desquelles l'action est nulle. Par contre, entre ces deux chiffres extrêmes, l'activité suit une courbe en cloche, elle augmente jusqu'à un certain pH appelé pH optimum, puis diminue si le pH continue de monter. Cet optimum peut se rencontrer dans une zone plus ou moins étalée et différente suivant la provenance de l'enzyme.

Pour l'amylase pancréatique et salivaire de l'homme, le pH optimum est de 6,9, mais l'activité est pratiquement identique entre 6,8 et 7,4, alors que pour la diastase de l'*Aspergillus* ou de *B subtilis*, l'action la plus importante se situe entre 5,2 et 6,4. Le pH optimum est variable suivant la température utilisée ; ce sont deux facteurs qui sont en relation étroite et qui doivent être modifiés simultanément. Par exemple, pour l'amylase du malt, le pH optimum qui est de 4,4 à 40° passe à 6 pour une température de 60°.

c) La température.

En général, les enzymes sont détruits lorsqu'on élève la température au-delà d'une certaine limite. Les α amylases sont plus résistantes à la chaleur que les β amylases, mais elles sont totalement inactivées au-dessus de 75°. Un abaissement de température ralentit puis inactive complètement les enzymes, mais cette inactivation est réversible. C'est ainsi que l' α amylase du pancréas humain est purifiée par cristallisation à 0° (FISCHER et Coll.) [28]. C'est à 40° que l'activité de l' α amylase est la plus importante. On admet qu'un abaissement de température de 40 à 37° entraîne une diminution de l'activité de l'ordre de 10 %. Cette perte d'activité peut être compensée par un allongement du temps de réaction.

d) Les activateurs.

Tous les enzymes sont sensibles à l'action de certaines substances, qui, à de très faibles quantités, sont capables d'augmenter leur activité.

L' α amylase pancréatique est fortement activée par le chlorure de sodium. Par contre, ce dernier ne joue aucun rôle dans l'activité des α amylases provenant de *B subtilis* ou des *Aspergillus* (HOBSON) [40].

e) Les inhibiteurs.

Lors du dosage des enzymes, les inhibiteurs se rencontrent d'abord dans les produits de dégradation du substrat. Ainsi, pour l'amylase, le glucose et le maltose ralentissent la réaction. Cette inhibition devient sensible pour une concentration en glucose et en maltose voisine de 2 pour mille. Nous avons vu que c'est une des raisons pour lesquelles on doit utiliser un excès de substrat pour le dosage de l'amylase, c'est aussi pourquoi l'on doit tenir compte de la glycémie si le dosage est effectué dans le sang.

En dehors des sucres, les amylases sont inhibées par d'autres substances, le Codex 1949 mentionne le tanin, les sels de fer, de nickel, de zinc et de cuivre.

Certains détergents constitués par des ammoniums quaternaires, ou par des produits tels le lauryl sulfate sont inhibiteurs. Le mode d'action est d'ailleurs différent pour les deux groupes chimiques (POMERANZ) [67].

On retrouve dans la formule des ammoniums quaternaires inhibiteurs une chaîne cétyl. Ceux qui possèdent les radicaux tétraméthyl, tétraéthyl, triphényl, tétrazolium ne sont pas inhibiteurs. L'anion de l'ammonium quaternaire est sans importance ; les chlorure, bromure, iodure ou acétate de cétyltriméthyl ammonium ont une action inhibitrice identique. Cette action est comparable pour toutes les α amylases, celle d'origine bactérienne présentant toutefois une résistance légèrement supérieure. L'inactivation est variable suivant le pH du milieu et le temps de contact entre l'enzyme et l'ammonium.

Les détergents du type laurylsulfate ont également une action inhibitrice, mais uniquement en l'absence d'ions Ca^{++} (précipitation du détergent en présence du calcium). L'action inhibitrice des ammoniums quaternaires est neutralisée par l'addition de laurylsulfate en quantité stéchiométrique.

De nombreux antiseptiques, tels les parahydroxybenzoate de méthyle ou de propyle, le fluorure de sodium sont sans action sur l' α amylase.

L'AMYLASE SANGUINE ET URINAIRE

En 1846, MAGENDIE [53] signala la présence d'amylase dans le sang humain. Ce n'est cependant qu'au début de ce siècle, que des méthodes permettant de doser cet enzyme ont été mises au point, ouvrant ainsi la voie à l'enzymologie clinique.

I. — NATURE DE L'AMYLASE SÉRIQUE

Tous les auteurs admettent que l'amylase humaine est une α amylase ; par contre, les avis diffèrent lorsqu'il s'agit d'en préciser la constitution. D'après J. COURTOIS [18] « l'amylase du sérum se comporte comme une globuline ». Pour McGEACHIN et LEWIS [33], l'amylase d'un sérum normal aurait une mobilité électrophorétique identique à celle de l'albumine, alors que celle provenant de sérums de malades atteints de pancréatite migrerait, comme l'amylase pancréatique et salivaire, avec les globulines. MATSAMITSU, KAWAGUCHI et J. EDWARD BECK [54] localisent l'enzyme des sérums normaux essentiellement au niveau des globulines, mais en trouvent également une partie sur l'albumine. Au cours des pancréatites, ils notent que l'augmentation de l'activité amyliasique se produit au niveau des globulines.

WILDING, COOKE et GADDIE [93] qui ont fractionné des sérums au moyen de gel de dextrane, affirment que l'amylase n'est pas liée aux protéines. Ils signalent cependant un cas de pancréatite où l'enzyme était lié aux γ globulines, ce qui avait pour effet d'entraîner une élimination urinaire faible. Tout récemment enfin (février 1965), UJIHIRA et Coll. [87] ont pu localiser l'enzyme sur les γ globulines auxquelles il serait très faiblement lié. Pour ces auteurs, l'amylase elle-même est une protéine de faible poids moléculaire.

Cette question de la nature protéique de l'amylase sérique humaine, apparaît donc pour l'instant très controversée. Il est cependant logique de penser que les méthodes modernes de fractionnement permettront d'apporter assez rapidement une solution. Il ressort

toutefois des derniers travaux qu'il existe vraisemblablement une différence de nature entre l'amylase sérique normale et l'amylase sérique pathologique. Ce fait serait susceptible d'avoir une importance diagnostique.

II. — ORIGINE DE L'AMYLASE SERIQUE

La question de l'origine de l'amylase sérique normale pourrait à première vue paraître superflue, car il semblerait logique de la situer dans les organes sécréteurs de ce ferment : les glandes salivaires et le pancréas.

L'inflammation des parotides, ou la ligature du canal de Sténon amènent en effet une augmentation de l'amylasémie. On remarque encore que ce taux s'accroît lors des pancréatites, ou après ligature des canaux excréteurs du pancréas. Mais à l'inverse, il faut aussi noter que la pancréatectomie et l'exérèse des glandes salivaires chez l'animal ne suppriment pas l'amylasémie. Ce fait expérimental conduit à se demander quelle est ou quelles sont les sources de l'amylase sérique normale qui serait, d'après les travaux cités précédemment, différente quant à sa constitution, des amylases pancréatiques et salivaires. Ces dernières ne passant dans le sang qu'à l'occasion de phénomènes pathologiques.

En dehors des glandes salivaires et du pancréas, il existe certains organes dont les tissus sont particulièrement riches en amylase, notamment le foie, la muqueuse intestinale, les trompes de Fallope. Cette concentration élevée n'est pas due à une simple irrigation des tissus par le sang, car ROE, SMITH et TREADWELL [73] ont trouvé plus d'enzymes dans le tissu hépatique que dans le sang de l'organe. De plus, GRAY, PROBSTEIN et HEIFETZ [36] ont pu mettre en évidence une diminution de l'amylasémie, lors des destructions du parenchyme hépatique. Enfin, McGEACHIN et Coll. [32], qui ont dosé l'amylase dans les tissus et les liquides extracellulaires d'animaux privés de pancréas et de glandes salivaires, ont trouvé au niveau du foie un taux d'amylase cellulaire supérieur à celui du liquide extracellulaire.

Faut-il en fonction de ces faits envisager une concentration et un stockage de l'amylase salivaire et pancréatique au niveau de ces organes, et du foie en particulier, ou admettre qu'ils sont eux-mêmes sécréteurs d'amylase ?

Cette deuxième hypothèse semble retenue par BERNARD et Coll. [10] qui écrivent : « Nous serions enclins à penser que la sécrétion, le stockage, et l'utilisation ont lieu dans un même organe, rappelant ce qui se passe pour le glycogène dans le foie ».

L'amylase sérique normale trouve-t-elle son origine dans les tissus de ces organes « amylogènes », ou bien l'ensemble des cellules qui en renferment toutes un peu, participent-elles à cette genèse ? La question reste posée.

Il ne faut pas oublier non plus que certaines bactéries intestinales sont susceptibles de produire de l'amylase, qui, en certaines circonstances, pourrait passer dans le sang.

III. — ROLE DE L'AMYLASE SERIQUE

Ainsi que nous venons de le voir, on trouve de l'amylase dans tout l'organisme. Doit-on en faire un simple matériau de déchet, ou doit-on supposer qu'elle puisse jouer un rôle dans la glycogénolyse, bien que cette dernière se fasse par un processus qui lui est propre, ne mettant pas en jeu de ferments amylolytiques ?

Peu de faits permettent de préciser le rôle de l'amylase. Nous savons cependant que :

— L'injection d'amylase à l'animal n'est suivie d'aucun phénomène caractéristique.

— RITAMA [71] constate que l'injection d'amylase dans la veine marginale de l'oreille du lapin est suivie d'une hyperamylasémie. Celle-ci régresse rapidement, l'élimination se faisant par les urines.

— BERNARD et Coll. [10] ont montré que l'amylase n'intervenait pas directement dans la nécrose hémorragique du pancréas. Ils

injectent à des animaux de l'amylase purifiée de porc, dans le parenchyme hépatique, et observent qu'il ne s'en suit aucun accident nécrotique.

— Le rôle de l'amylase dans la glycogénolyse n'est pas à exclure formellement.

GULZOW [37] a mis en évidence que chez le chien à jeun, l'injection d'adrénaline qui provoque une mobilisation du glycogène, entraîne consécutivement une diminution de l'amylase sérique. Ce taux revient à la normale si l'on injecte du glucose et de l'insuline à ce même chien.

Ces quelques expériences ne permettent cependant pas de fixer une fonction à l'amylase, dont le rôle reste toujours aussi obscur.

IV. — L'AMYLASE URINAIRE

L'excrétion d'amylase par l'urine paraît résulter directement du déversement de l'amylase sanguine, bien que l'on puisse se demander comment cet enzyme de nature protéique arrive à franchir le glomérule. Le parallélisme qui existe dans les modifications du taux de l'amylase sanguine et urinaire est d'ailleurs évident au cours d'affections telles que les pancréatites ou les oreillons. Ce fait, nous l'avons vu, a d'ailleurs été confirmé expérimentalement après injection d'amylase dans le sang. De même, la ligature du canal de Wirsung provoque une élévation simultanée de l'amylase sanguine et urinaire.

Leur origine et leur nature semblent donc identiques. SOMOGYI [80] note cependant qu'au cours de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase urinaire, les sucres libérés renfermeraient 41 % de glucose, alors qu'avec l'amylase sérique, ils n'en renfermeraient que 5,4 %.

V. — LE DOSAGE DE L'AMYLASE

A) PRINCIPES DES METHODES DE DOSAGE

Les techniques proposées pour le dosage de l'amylase sont extrêmement nombreuses ; elles découlent toutes des principes généraux basés sur les propriétés respectives de l'amylase et de l'amidon et qui sont :

— La mise en évidence de la diminution de la viscosité de l'empois d'amidon (action fluidifiante de l'amylase).

— Le dosage des sucres réducteurs formés à partir de l'empois d'amidon (action saccharifiante de l'amylase).

— La modification de l'intensité de la coloration bleue, donnée par l'iode et par l'empois d'amidon (action dextrinante de l'amylase). Cette mesure peut se faire :

- en recherchant la plus petite dilution d'un sérum, ou d'une urine susceptible de faire disparaître la coloration bleue (méthode dite des dilutions limites de Wohlgemuth) ;

- par l'appréciation photométrique de la coloration bleue après avoir fait agir l'amylase pendant un temps donné (méthodes dites iodométriques) ;

- par la détermination du temps nécessaire à la disparition complète de la coloration bleue (méthode amyloclastique de SOMOGYI).

B) MÉTHODES BASÉES SUR L'ACTION FLUIDIFIANTE DE L'AMYLASE

Ces méthodes sont surtout utilisées dans l'industrie. Pour les mettre en œuvre, on utilise des viscosimètres de torsion spéciaux dits amylographes. Par contre, en biologie clinique, leur intérêt est très restreint ; MAYER et FINKELSTEIN [55] ont cependant proposé une technique pour le dosage de l'amylase urinaire.

C) MÉTHODES BASÉES SUR L'ACTION SACCHARIFIANTE DE L'AMYLASE

Les techniques appartenant à ce groupe sont très nombreuses. D'une manière générale, lorsque les conditions opératoires sont bonnes, elles permettent d'obtenir des résultats précis. Leur inconvénient commun réside dans le fait qu'elles sont assez longues à exécuter, car elles font intervenir des opérations successives (digestion, déprotéinisation, dosage des sucres), qui prennent du temps.

Les différences qui existent entre elles sont du point de vue technique assez minimes, elles peuvent cependant conduire à des résultats nettement divergents.

Ces différences portent essentiellement sur :

- le choix de l'amidon,
- la température et la durée de l'incubation,
- le milieu d'incubation,
- la concentration en amidon,
- la méthode de dosage des sucres.

1) Le choix de l'amidon.

Les avis sur ce sujet sont extrêmement partagés, et les divergences commencent lorsqu'il s'agit de fixer l'origine botanique de l'amidon. Nous avons déjà vu que pour SOMOGYI, l'amidon de maïs est le meilleur, alors que pour J. AGNERAY et la plupart des auteurs français, la fécule de pomme de terre et l'amidon de blé conviennent très bien.

La présentation de l'amidon est également un point de désaccord. Certains utilisent l'amidon ordinaire (CHROMETZKA [16], SCOZ et GUZZI [77], d'autres (SOMOGYI [83], DORCHE et Coll. [22]) un amidon purifié. J. AGNERAY [1] est contre ce dernier procédé et écrit : « Il est bon de noter qu'il est souvent nuisible de chercher à purifier les amidons du commerce, la teneur en sucres réducteurs augmente et la stabilité à 37° diminue ». Enfin, les amidons solubles

ont leurs partisans et leurs détracteurs. Ces derniers sont utilisés par MYERS et KILLIAN [59], par J. AGNERAY. SOMOGYI, par contre, en déconseille formellement l'emploi : « From the beginning I insisted upon the use of corn starch as a substrate and raised objections to substitution by soluble starch ». Il est d'ailleurs curieux de noter que certaines techniques portant en référence le nom de SOMOGYI (Standard Methods of Clinical Chemistry - Vol. 1, page 8) incluent dans leurs réactifs l'amidon soluble selon LINTNER.

Le glycogène a été proposé (OTTENSTEIN [60], BALTZER [4], PALLADIN et GOLSTEIN [63]), mais il semble que son emploi doive être écarté « c'est une matière première peu courante et très irrégulière d'un lot à un autre. PAGET et DELASSE [61] ont montré qu'il passait partiellement dans le filtrat après défécation ferrocyanozinque. Le glycogène en milieu alcalin et chaud réduit l'iodomercurate de potassium et donne une erreur par excès » (J. AGNERAY).

Devant des opinions aussi contraires, il paraît difficile de faire un choix. Une conclusion en découle cependant, l'amidon utilisé pour le dosage de l'amylase doit être contrôlé et standardisé. Contrôlé pour vérifier qu'il ne renferme pas d'impuretés, des sucres réducteurs en particulier, standardisé pour s'assurer que d'une préparation à une autre, il donne sur une solution d'amylase de référence, des résultats constants.

2) La température et la durée de l'incubation.

Les températures d'incubation sont généralement de 40° ou de 37°. 40° parce que c'est la température optimum, 37° pour des raisons de commodité, les bains-marie de laboratoire étant généralement réglés de cette manière.

Pour une même durée d'incubation de 30 minutes, les chiffres obtenus à 37° sont plus bas de 10 % ; c'est pourquoi la plupart des auteurs qui ont adopté cette température ont choisi, soit de tenir compte de cette différence dans l'établissement des résultats normaux, tout en maintenant le temps d'incubation à 30 minutes, soit de porter ce temps à 35 minutes. D'une manière générale, les résultats sont exprimés en unités SOMOGYI. (Pouvoir réducteur exprimé en mg de glucose pour 100 ml de sérum).

3) Le milieu d'incubation.

La première question qui se pose est celle du pH. Certains auteurs n'utilisent pas de tampon et font les dilutions du sérum, soit dans l'eau distillée (FLEURY, COURTOIS et FABIANI [26]), soit dans un diluant de pH déterminé enrichi en chlorures (DORCHE [22]). D'autres tamponnent le milieu en incorporant un tampon phosphate à l'empois d'amidon (PAGET-DELAISSE [61], SOMOGYI [83]), ou bien en diluant le sérum dans une solution de phosphates. Le pH des tampons utilisés est généralement compris entre 6,8 et 7,4, ce qui est logique, puisque c'est dans cette zone que l'activité amylasique est optimale. RODRIGUEZ OLLEROS [72] et SOMOGYI [83] ajustent leurs tampons à 6,8. SOMOGYI fait d'ailleurs remarquer que dans ces conditions, le pH du milieu d'incubation est de 7, étant donné la légère alcalinité de l'amidon. PAGET et LIEFOOGHE [62] tamponnent le milieu à pH 7,4. Enfin, récemment, SAX et TRIMBLE [75] ont utilisé un tampon Tris-HCl de pH 7,2

L'emploi ou non d'un tampon n'a sans doute pas beaucoup d'importance dans le cas de l'amylase sérique, étant donné la marge de pH assez grande (6,8-7,4) dans laquelle peut être effectué le dosage. Mais celui-ci devient indispensable pour le dosage de l'amylase dans l'urine, à cause des variations importantes de pH qu'elle peut présenter.

D'autres éléments qui sont les activateurs et les conservateurs interviennent également dans la composition du milieu d'incubation.

Nous avons vu que le chlorure de sodium est un activateur des α amylases. Ceci explique pourquoi de nombreux auteurs font entrer du chlorure de sodium dans la composition de leurs réactifs, que ce soit dans le substrat (SOMOGYI), ou dans le diluant (DORCHE). Pour PAGET et DELAISSE, cette addition n'est pas indispensable, ils écrivent en effet : « l'ion Cl^- , aux concentrations variables susceptibles d'être notées en clinique, n'a aucune importance sur l'activité amylasique ».

Les conservateurs utilisés pour éviter la contamination du substrat sont : le toluène, le fluorure de sodium, le paraoxybenzoate de méthyle, le paraoxybenzoate de propyle. Tous, bien entendu, n'ont aux concentrations utilisées aucune action inhibitrice vis-à-vis de l'amylase.

DORCHE et ROULLET [22] ajoutent quelques gouttes de toluène à leur empois d'amidon, mais précisent que, dans ces conditions, sa conservation ne peut excéder quelques jours au réfrigérateur.

L'emploi du paraoxybenzoate de propyle a été préconisé par WENGER [90]. SOMOGYI [83] l'utilise pour compléter l'action antibactérienne du fluorure de sodium à propos duquel il écrit « Sodium fluoride is a preservative that does not poison amylase (as a matter of fact, it activates it nearly as well as NaCl) but was found to be of only limited effectiveness ». RICE [69] dit obtenir de très bons résultats avec l'acide sorbique.

L'emploi de conservateurs est utile sinon indispensable, lorsque les substrats sont conservés à l'état liquide. S'ils sont lyophilisés, le risque de contamination microbienne ou fongique est évidemment moins important, mais l'emploi d'un antiseptique peut permettre de stopper un développement microbien, lorsque l'examen est pratiqué sur un milieu souillé, l'urine notamment.

4) La concentration de l'empois d'amidon.

Le plus souvent, l'empois a une concentration en amidon de 1,5 %. Ce choix correspond à trois impératifs :

- mettre la plus grande quantité possible d'amidon dans un volume de substrat déterminé, de manière à en avoir un large excès par rapport à la quantité d'enzyme à doser ;

- disposer d'une solution dont la viscosité ne soit pas trop importante ;

- ne pas apporter avec l'amidon une trop grande quantité de produits réducteurs.

Ces considérations expliquent pourquoi presque tous les auteurs ont adopté cette concentration.

5) Le rapport substrat-sérum.

On trouve ici deux groupes de techniques, celles qui emploient 5 ml de substrat pour 1 ml de sérum (SOMOGYI, DORCHE, FLEURY-

COURTOIS-FABIANI) et celles qui utilisent 5 ml de substrat pour 0,5 ml de sérum (PAGET-DELAISSE). Tous les auteurs considèrent cependant que la quantité de substrat doit être excédentaire par rapport à la quantité d'enzyme à doser. Tous admettent que pour qu'un dosage d'amylase reste valable, la quantité d'amidon hydrolysée ne doit pas dépasser 5 %. Etant donné que les quantités de sérum utilisées d'une série de techniques à l'autre varient du simple au double, les quantités limites d'amylase pouvant être dosées, varieront également du simple au double. Environ 500 unités SOMOGYI pour les méthodes utilisant 1 ml de sérum, environ 1000 unités SOMOGYI pour un prélèvement de 0,5 ml. Au-delà de ces chiffres, il conviendra de diluer la prise d'essai.

6) Le dosage des sucres réducteurs.

Pratiquement, toutes les méthodes de dosage des sucres réducteurs ont été appliquées au dosage de l'amylase. Les variantes portant sur les procédés de défécation sont également multiples. Cette abondance n'a sans doute pas contribué à la standardisation du dosage.

Le tableau ci-après résume les principales d'entre elles.

Auteurs	Procédés de défécation	Dosage des sucres réducteurs
PAGET-DELAISSE [61]	Ferrocyanozincique	Réactif iodomercuriel. Dosage de l'iode libéré par $S_2O_3Na_2$ (Baudoin-Lévine).
FLEURY-COURTOIS [29] - FABIANI [26]	Acide Tungstique	Solution cupro-alkaline. Réactif Phosphomolybdique (Folin et Wu).
DORCHE-ROULLET-DEBAT [22]	$SO_4Zn + NaOH$	Solution cupro-alkaline. Réactif arséniomolybdique. Fin du titrage par MnO_4K (Ost-Dorche).
SOMOGYI (Modification de N.F. YOUNG) [96]	$SO_4Cu +$ Tungstate de Sodium	Solution cupro-alkaline et réaction arséniomolybdique (Nelson et Somogyi) ou Phosphomolybdique (Folin et Wu).
SOMOGYI [83]	$SO_4Zn + Ba(OH)_2$	Solution cupro-alkaline et réactif arséniomolybdique.
BALTZER [4]	$SO_4Cd + NaOH$	Hagedorn Jensen.
KIBRICK-ROGERS-SKUPP [43]	Acide trichloracétique + Sulfate d'ammonium + Charbon activé	Anthrone.

Les remarques suivantes peuvent être faites à propos de ces différentes techniques :

— REACTIFS PRÉCIPITANT DES PROTEINES. Ces réactifs doivent satisfaire à deux conditions :

- donner des filtrats clairs,
- stopper la réaction enzymatique.

L'hydrate de zinc paraît bien convenir. SOMOGYI [83] qui utilisait le sulfate de cuivre et le tungstate de sodium comme agents de déprotéinisation, écrit dans une de ses dernières publications : « It should be noted that precipitation by copper and tungstate has been replaced by zinc precipitation ; the latter produces a clearer filtrate, and it has been ascertained that it stops enzyme action as completely as the copper precipitation ». Ceci avait d'ailleurs déjà été noté par DORCHE et Coll. (Lyon Pharmaceutique (7), 211, 1951) et a été confirmé depuis par SAX et TRIMBLE (Clin. Chem. (9), 297, 1963). Nous-même avons pu constater que la défécation au zinc donnait des filtrats plus limpides que la défécation au tungstate. Pour J. AGNERAY [1], cependant, la technique de déprotéinisation intervient peu : « que l'on choisisse une défécation nitromercurique, ferrocyanozincique, ou tungstique, on obtient sensiblement les mêmes résultats ».

— REACTIFS UTILISES POUR LE DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS.

Les composés réducteurs formés après action de l'amylase sur l'amidon, sont constitués par du maltose, mais aussi par du glucose et des polysaccharides. Par conséquent, des techniques donnant des résultats très satisfaisants pour la détermination du glucose urinaire, ou sanguin, ne conviendront pas obligatoirement au dosage de l'amylase. SOMOGYI est formel à cet égard. Il considère qu'un réactif satisfaisant doit permettre de doser totalement les sucres réducteurs, et qu'il convient de vérifier ce fait, avant d'appliquer au dosage de l'amylase, une méthode initialement mise au point pour le dosage du glucose. D'après cet auteur, la non-observation de cette recommandation serait susceptible d'entraîner des erreurs de 20 à 30 % par défaut.

En résumé, et malgré les points de divergence qui ont été évoqués, les méthodes saccharogéniques sont dans leur ensemble susceptibles de donner des résultats valables, à condition de respecter les règles générales de l'analyse en chimie biologique. Une certaine confusion apparaît au niveau de l'expression des résultats, liée le plus souvent à la définition de l'unité ; ce problème sera abordé plus loin.

D) MÉTHODES BASÉES SUR L'ACTION DEXTRINANTE DE L'AMYLASE

La première technique basée sur ce principe a été décrite en 1908 par WOHLGEMUTH [94]. Elle consiste à faire incuber pendant une demi-heure une quantité donnée de substrat avec des dilutions croissantes du sérum à étudier. Après ce laps de temps, on ajoute à chaque tube, une solution d'iode, et l'on détermine la plus petite dilution de sérum, où il n'apparaît pas de teinte violette. L'inverse de la dilution représente l'activité amylasique du sérum exprimée en unités WOHLGEMUTH. Cette méthode séduisante par sa simplicité est encore employée ; elle a reçu cependant de nombreuses modifications, dont la plupart (HUGGINS et RUSSEL [42], SMITH et ROE [79]...) ont eu pour but d'augmenter la précision des mesures.

En général, leur principe consiste à mettre à incuber pendant un temps donné, avec le substrat, l'urine ou le sérum à doser, puis à y ajouter une solution d'iode. On lit l'intensité de la coloration bleue obtenue, et l'on définit l'activité amylasique en se reportant à une courbe d'étalonnage qui a été établie en mettant en présence des quantités variables d'amidon et des quantités fixes d'iode.

Ces méthodes apparaissent à première vue très séduisantes. Malheureusement, leur précision dépend presque exclusivement du substrat amidon. Il n'est pas rare d'obtenir des résultats entièrement différents si l'on utilise non seulement des amidons d'origine diverse, mais encore des amidons de même origine provenant de lots de fabrication différents. J. DORCHE et M.A. REVOL insistent sur ce fait dans une note présentée à la Société de Pharmacie de Lyon en décembre 1958 [21]. Pour que les résultats restent valables, il convient de faire pour chaque série de titrage, un pré-étalonnage de l'empois d'amidon, afin que les colorations obtenues soient convenables ; mais, alors, le titrage perd son avantage de rapidité et devient très fastidieux.

Il faut cependant remarquer que ce type de technique peut s'adapter à l'analyse en continu. Un essai d'adaptation a d'ailleurs été décrit récemment par SCHEIDT [76].

Par ailleurs, on retrouve, comme dans le cas des méthodes saccharogéniques, des variantes portant sur les quantités de sérum et de substrat à utiliser, sur le temps et les températures d'incubation... Ceci conduit à des modes d'expression très disparates, car il n'existe plus, comme dans l'autre groupe de techniques, ce point commun qui est l'énoncé du résultats en mg de glucose pour 100 ml de sérum. Un tableau publié par M. METAIS [56] reflète très bien cet état de choses.

Auteurs	Volume de plasma utilisé (ml)	Temps d'incubation (minutes)	Définition de l'unité	Valeurs normales
HUGGINS et RUSSEL (1948) [42]	1	30	1 mg/ml	9-35
ZINKER et REITHEL (1949) [99]	0,5	5	0,01 mg/min/ml	27
SMITH et ROE (1949) [79]	1	30	10 mg/ml	25-135
VINCENT et SEGONZAC (1951) [88]	0,5	30	1 mg/ml	5-25
VAN LOON et Coll. (1952) [52]	0,1	15	5 mg/100 ml	60-100
RICHTERICH (1961) [70]	0,02	30	10 mg/100 ml (en amidon détruit)	200

Nous avons mis à part la méthode amyloclastique de SOMOGYI, parce qu'elle fait l'objet d'une partie de ce travail, mais aussi parce que son principe est quelque peu différent de celui des méthodes mentionnées plus haut.

Elle consiste à apprécier le TEMPS au bout duquel un sérum ou une urine renfermant de l'amylase sont susceptibles de faire disparaître la coloration bleue donnée par des quantités bien déterminées d'iode et d'amidon. Il ne s'agit plus, comme dans la technique de WOHLGEMUTH, d'apprécier une dilution limite mais un temps limite.

Elle est séduisante à plusieurs égards :

- simplicité des manipulations ;
- définition et mode de préparation précis du substrat ;
- expression des résultats dans une unité classique, l'unité saccharogénique de SOMOGYI.

Nous la décrivons plus tard de manière détaillée.

VI. — LE PROBLEME DES UNITES

Il existe dans le cas de l'amylase, comme pour tous les dosages d'enzyme, un problème des unités.

Nous avons vu que pour les méthodes saccharogéniques, l'unité la plus fréquemment employée est l'unité SOMOGYI qui se définit de la manière suivante :

Quantité ou activité de l'enzyme contenue dans 100 ml de sérum et provoquant à partir d'un substrat amidon, la formation d'un mg de sucres réducteurs exprimés en glucose à 40°, à pH 7, et en 30 minutes.

Dans certains cas, le dosage se fait à 37°, ce qui a pour conséquence d'entraîner une disparité des résultats normaux.

Pour les méthodes iodométriques, l'unité la plus ancienne est l'unité WOHLGEMUTH. Cette unité correspond à la quantité d'amylase contenue dans 1 ml de liquide biologique et susceptible d'hydrolyser en 30 minutes à 37°, un mg d'amidon. Dans ce groupe de méthodes, ainsi que le met en évidence le tableau de P. METAIS, la plupart des auteurs ont dû créer des unités nouvelles pour chaque technique, d'où une très grande diversité dans l'expression des résultats.

Cet état de chose conduit à créer des équivalences plus ou moins valables. P. METAIS [56] en donne un exemple en disant : « On peut donc écrire, quoique ce calcul ne repose sur aucune donnée biochimique certaine, qu'une unité WOHLGEMUTH correspond à environ 8 à 10 unités SOMOGYI ».

Comment remédier à cette situation ? P. METAIS propose d'exprimer tous les résultats en unités SOMOGYI et en unités WOHLGEMUTH et d'abandonner tous les autres systèmes. Ceci paraît relativement aisé dans le cas des unités SOMOGYI, mais beaucoup moins facile pour les unités WOHLGEMUTH, car les conditions opératoires des méthodes iodométriques sont souvent très différentes.

J. AGNERAY [1] se référant aux travaux de la commission internationale de Chimie Clinique, propose une rationalisation de l'unité amylasique qu'il souhaiterait voir exprimer « soit en micromoles de maltose libérés, soit en milliéquivalents d'iode consommés par ce maltose (?), selon une technique bien définie ».

De toute manière, en attendant qu'une définition unique de l'unité soit donnée, il faut, en rendant les résultats d'un dosage, préciser l'unité utilisée, et les normales correspondant à la méthode employée.

VII. — LE DOSAGE DE L'AMYLASE EN CLINIQUE VARIATIONS NORMALES ET PATHOLOGIQUES

Nous venons de voir que la multiplicité des unités rend difficile l'expression et la comparaison des résultats normaux. Afin de simplifier, nous utiliserons aussi souvent que possible les unités SOMOGYI.

A) LES VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DE L'AMYLASEMIE

Le taux normal de l'amylase sérique varie dans des limites assez importantes. SOMOGYI [83] donne comme valeurs extrêmes 80 à 180 unités, PAGET et DELAISSE [61] 40 à 160 U. S. *. Chez un même individu, les variations physiologiques de l'amylasémie sont assez faibles. Le taux le plus bas se situe dans la matinée, il y a ensuite une augmentation pendant la période digestive, après le repas de midi, avec un maximum en fin d'après-midi. Mais ces variations ne dépassent pas 10 % de l'activité totale. Le mode d'alimentation ou même le jeûne ne modifient pas l'amylasémie (COURTOIS) [18].

* U. S. = unité Somogyi.

B) LES VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DE L'AMYLASURIE

Il est assez difficile de fixer des valeurs normales pour l'amyasurie, étant donné que la composition et l'excrétion urinaire varient assez considérablement. Beaucoup d'auteurs préfèrent établir les taux d'amyase non pour 100 ml ou par litre, mais en tenant compte de la quantité d'urine émise en 1 heure ou en 24 heures, d'où le calcul des deux valeurs suivantes :

— **Débit heure** : nombre de mg de glucose traduisant l'activité amyasique des urines pendant 60 minutes.

— **Débit heure moyen** : débit horaire calculé en fonction du nombre de mg de glucose traduisant l'activité amyasique de la totalité des urines émises pendant 24 heures. Dans ce cas, les urines sont recueillies sur fluorure (PAGET et LIEFOOGHE [62]).

Le débit heure moyen normal peut être compris entre 120 et 430 U.S. (PAGET). GAMBILL et Coll. [31] qui ont étudié l'élimination urinaire chez une centaine d'individus normaux, prennent comme limite supérieure 300 unités SMITH et ROE par heure avec un taux moyen de 127 unités/ROE/heure. Mais la plupart des auteurs sont d'accord pour dire qu'on peut considérer comme pathologique un débit heure moyen supérieur à 600 U.S. L'élimination urinaire varie légèrement au cours de la journée : elle est constante pendant toute la matinée, puis augmente dans l'après-midi, avec un maximum entre 17 h et 19 h, puis diminue à nouveau jusqu'au matin (VINTILESCO, IONESCO, MANDROI [89]).

D'après PAGET et LIEFOOGHE [62], on ne peut généraliser ces constatations, les variations au cours d'une même journée ne se produisant pas toujours dans le même sens entre le matin et le soir. En fait, il semble bien que l'amyasurie soit le reflet de l'amyasémie.

Pour NORBY, l'activité amyasique de l'urine serait inversement proportionnelle au volume d'urine, mais pour d'autres (PAGET, LIEFOOGHE), il n'y a pas de relation entre le volume urinaire et le débit amyasique, tout au moins si la diurèse est normale ou augmentée.

En conclusion, pour qu'une variation de l'activité amyasique urinaire, puisse être considérée comme pathologique, elle doit différer d'au moins 25 % des valeurs normales.

C) LES VARIATIONS PATHOLOGIQUES DE L'AMYLASEMIE ET DE L'AMYLASURIE

Nous étudierons simultanément les variations pathologiques de l'amylase dans le sang et dans l'urine, car les modifications se produisent en général parallèlement dans ces deux liquides biologiques. Nous avons cependant cité un cas (WILDING et Coll. [93]) où une amylasémie élevée ne s'accompagnait que d'une amylasurie faible, bien que le sujet étudié ne présentât pas d'atteinte rénale.

1 - Affections des glandes salivaires.

Dans la plupart des affections des glandes salivaires (inflammations des glandes, obturations des canaux sécréteurs, infections parotidiennes), les résultats obtenus montrent une augmentation nette de l'amylase urinaire et sanguine. D'après de nombreux auteurs, APPLEBAUM [2], CANDEL, WHEELLOCK [13], SEDAILLAN [78]..., ce dosage de l'enzyme serait fort utile pour le diagnostic des oreillons. SEDAILLAN et Coll. ont montré que l'amylasémie s'élève deux à trois jours après l'apparition des signes cliniques. Les taux se situent généralement entre 130 et 400 unités, mais peuvent atteindre et dépasser 1000 unités. La régression commence au bout du 10^e jour ; l'amylasurie suit la même courbe d'évolution, mais les variations sont de plus forte amplitude. Les titres peuvent être très hauts, dépassant souvent 1000 unités, et deux cas sont cités où ils atteignent 4000 et 4500 unités.

SEDAILLAN et Coll. font état de 87 % d'amylasémies élevées dans les parotidites ourliennes et de 71 % dans les cas de méningites ourliennes. Les pourcentages cités pour l'amylasurie sont respectivement de 89 et 80 %. Pour ces auteurs, la détermination simultanée de l'amylasémie et de l'amylasurie présente de l'intérêt pour le diagnostic des oreillons (élimination d'affections ayant des signes cliniques voisins : adénopathie), pour le diagnostic des méningites ourliennes et pour le dépistage précoce de sujets se trouvant en milieu contaminé. Dans ce dernier cas, des taux élevés d'amylase ont été trouvés chez des individus ne présentant pas de signes cliniques évidents.

2 - Affections du pancréas.

C'est dans ce type de maladie que les modifications de l'amylasémie et de l'amylasurie sont les plus importantes.

Dans les pancréatites aiguës, l'augmentation sanguine est très fréquente, très importante, précoce, mais n'est pas durable. Elle est très nette aux premières heures de la crise (18 heures à 24 heures après le début). On atteint facilement des taux de 800 à 1000 U.S., et même 2000 U.S., mais ils diminuent rapidement et au bout d'une semaine, on retrouve des chiffres normaux, ou quelquefois diminués par suite de la destruction des cellules parenchymateuses (COURTOIS [18], BERNARD et Coll. [10]).

Cependant, dans tous les cas, le tableau n'est pas aussi schématique, et BERNARD et Coll., McCORKLE et GOLDMANN [17], ont décrit six types de courbes au cours de la pancréatite : « 1° ascension brusque et chute rapide ; 2° ascension brusque et chute à des chiffres légèrement au-dessus de la normale ; 3° fluctuations au niveau supérieur normal ; 4° persistance d'une hyperamylasémie élevée ; 5° nouvelles élévations plusieurs jours après le retour à une amylasémie normale ; 6° légère hyperamylasémie plusieurs jours après le début de la maladie ».

Des modifications analogues se produisent dans l'urine, aussi importantes, mais moins précoces : le maximum est atteint seulement en 3 ou 4 jours, et l'élévation se maintient pendant 10 à 15 jours. Il est donc nécessaire de déterminer simultanément l'amylasémie et l'amylasurie, car il arrive qu'on trouve un taux sanguin normal, alors que l'élimination urinaire est encore très importante.

Ces faits nous incitent à adopter la conclusion de BERNARD et Coll., qui écrivent : « En somme, devant un abdomen aigu, l'hyperamylasémie précoce, élevée aux environs de 800 mg % a 80 chances sur 100 d'être d'origine pancréatique ».

Mais même à ce taux, elle ne permet pas à elle seule de faire la différence entre une nécrose hémorragique et une pancréatite chronique, ni d'éliminer un syndrome aigu extra-pancréatique.

Il faut ajouter que FABIANI et Coll. [26] ont décrit récemment

un nouveau test permettant d'explorer la fonction exocrine du pancréas, surtout dans les atteintes pancréatiques chroniques : l'épreuve de l'hyperamylasémie provoquée.

Ce test se pratique de la manière suivante :

Prendre 10 ml de sang veineux au malade laissé à jeun depuis la veille au soir, recueillir sur héparine. Injecter au même moment 100 unités de pancréozyne par voie intra-veineuse. 30 minutes plus tard, prélever à nouveau 10 ml de sang et injecter 100 unités de sécrétine. Refaire des prélèvements de sang trente minutes, une heure et demie, trois heures et demie, cinq heures et demie après l'injection de sécrétine.

Faire le dosage d'amylase par la méthode saccharogénique de SOMOGYI sur chaque échantillon de sang.

Les résultats obtenus chez les sujets dont le pancréas a été reconnu normal après intervention, ont présenté des caractéristiques identiques dans 12 cas sur 14 : amylasémie de départ sensiblement normale (50-100 US), légère baisse au bout de 30 minutes, augmentation progressive avec maximum deux heures après la première injection, baisse légère à la quatrième heure, remontée à la sixième heure, ou diminution progressive.

Les deux autres cas étudiés présentent des courbes anormales, il s'agit d'individus diabétiques.

Par contre, dans 89 % des cas d'atteintes pancréatiques, l'allure de la courbe est très différente :

— dans les lithiases pancréatiques, les variations ont une amplitude plus grande avec taux de départ plus élevé et augmentation précoce avant l'injection de sécrétine, diminution à la deuxième heure ;

— dans les cas de pancréatites chroniques sans lithiasse radiologique, les courbes sont différentes mais ne ressemblent pas davantage aux courbes normales : taux de départ très bas (quelquefois inférieur à 50 US) puis montée progressive jusqu'à la quatrième heure, enfin chute lente.

Le nombre de cas de cancers du pancréas étudiés n'est pas suffisant pour pouvoir donner l'allure d'une courbe.

En résumé, les auteurs ont obtenu des courbes d'amyplasémie sensiblement identiques dans les cas où on n'a pu déceler d'atteintes pancréatiques. Sauf dans deux cas, où il s'agissait de diabétiques qui pourraient donner une réaction faussement positive.

Dans les pancréatites chroniques, les auteurs pensent qu'on ne peut encore juger la valeur exacte de cette épreuve, mais ils estiment qu'elle mérite une étude plus approfondie et qu'elle pourrait contribuer à faciliter le diagnostic de ce type d'affection.

3 - Affections abdominales autres que celles du pancréas.

— Affections présentant des signes cliniques voisins de ceux de la pancréatite.

Les augmentations les plus fréquentes se rencontrent dans certains cas d'ulcères perforés ou d'occlusions de l'intestin grêle et du duodénum. Dans les ulcères perforés (de l'estomac ou du duodénum) l'accroissement du taux est variable, mais peut s'élever jusqu'à 1.000 à 2.000 U.S. Les taux sont sensiblement les mêmes dans les occlusions intestinales, notamment si elles se trouvent près du duodénum.

— Atteintes hépatiques.

On note, dans les maladies provoquant une altération des cellules hépatiques, une diminution de l'activité amylasique sanguine et urinaire (hépatite épidémique, cirrhose, cancer).

Ceci n'a rien de surprenant puisque nous avons déjà vu que l'amylase serait normalement sécrétée en petite quantité par le foie.

Au contraire, dans les affections consécutives à une rétention ou à une obstruction (calculs biliaires, cholécystites chroniques, ictères par obstruction) les variations se produisent assez souvent en sens inverse et l'on a très souvent des augmentations aussi bien dans le sang que dans l'urine. L'élévation de l'amylasurie se produit en général en même temps que les crises douloureuses.

— Affections rénales.

Dans ce groupe d'affections, contrairement à ce que nous avons vu jusqu'à présent, les variations dans le sang et dans l'urine n'évoluent pas en parallèle. Des taux sanguins élevés se rencontrent chez des malades atteints d'insuffisances rénales aiguës ; dans la pyélo-néphrite on peut avoir des taux de 1.000 U.S. Le plus souvent l'amyasémie est normale ou légèrement supérieure à la normale, alors que l'amy-

lasurie est très fortement diminuée. Le rapport - $\frac{\text{Amylase sérique}}{\text{Amylase urinaire}}$

habituellement inférieur à 1 peut alors s'inverser (DORCHE et Coll. [22]).

4 - Variations du taux d'amylase consécutives à l'administration de médicaments.

Certains produits chimiques sont susceptibles d'amener des modifications de l'amyasémie. Leur mode d'action n'est pas toujours le même.

— Action sur les cellules hépatiques.

On a pu obtenir expérimentalement chez l'animal une diminution de l'amyasémie après anesthésie au chloroforme. L'intoxication phosphorée au contraire provoquerait une augmentation (COURTOIS [18]).

— Action parasymphaticomimétique.

L'administration de médicaments donnés comme analgésiques au cours des syndromes abdominaux aigus, pourrait être une cause d'erreur dans le diagnostic des pancréatites. Après des injections de morphine par exemple, on a pu obtenir des amyasémies supérieures à 550 unités. La morphine agit en provoquant une constriction du sphincter d'Oddi, d'où stase de la sécrétion pancréatique et passage de l'amylase dans le sang. Il en est de même pour la codéine, la prostigimine, et d'une manière générale, pour toutes les substances à action parasymphaticomimétiques.

D) MODIFICATIONS DU TAUX D'AMYLASE
DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES
AUTRES QUE LE SANG ET L'URINE

L'activité amylasique a été déterminée surtout dans les liquides péritonéaux (ascite) qui peuvent se rencontrer au cours de certaines crises abdominales aiguës. On a obtenu dans des cas confirmés de pancréatites aiguës des taux très supérieurs à ceux trouvés dans le sang. Cette élévation persiste plusieurs jours après que l'amylasémie soit redevenue normale (METAIS [56], BERNARD [10]) et a pu quelquefois servir au diagnostic dans le cas d'amylasémies normales.

On trouve parfois des taux d'amylase élevés dans des pleurésies hémorragiques, et dans des péricardites d'origine pancréatique.

DOSAGE
DE L'AMYLASE SANGUINE
ET URINAIRE

APPLICATION
DE LA METHODE AMYLOCLASTIQUE DE SOMOGYI

I. — INTRODUCTION

Dans les pages précédentes, nous avons présenté les principales méthodes de dosage de l'amyase sanguine et urinaire. On peut remarquer que les méthodes se terminant par un dosage des sucres réducteurs, exigent des prises d'essai relativement importantes, et qu'elles sont assez longues à réaliser ; or, le dosage de l'amyase peut être un examen d'urgence.

D'autre part, les méthodes iodométriques avec fin colorimétrique, a priori plus séduisantes, sont en définitive difficiles à utiliser, les variations dans la nature ou les qualités du substrat, ayant une influence considérable.

Nous avons pensé que la méthode amyoclastique de SOMOGYI, du fait de sa simplicité et de sa rapidité d'exécution, pouvait apporter des éléments intéressants. Proche de l'ancienne technique de WOHLGEMUTH, elle est cependant originale et présente l'avantage de permettre l'expression des résultats en unités SOMOGYI, maintenant familières aux médecins. C'est pourquoi, l'objet de ce travail a été d'essayer d'appliquer cette méthode, encore peu connue en France, au dosage de l'amyase sanguine et urinaire, et de la comparer avec quelques techniques plus couramment utilisées. La réalisation de ce travail aurait été assez simple si nous n'avions été gêné par l'absence d'une préparation amyasique de référence (internationale) et plus encore par la grande imprécision régnant au niveau de la préparation des substrats.

C'est la raison pour laquelle une place importante sera consacrée à ces deux questions.

II. — DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISEES

Les techniques que nous décrivons ci-après, méthodes saccharogéniques de SOMOGYI [83] et de DORCHE et Coll. [22], méthodes iodométriques de SMITH et ROE [79] et de SOMOGYI [83], sont celles que nous avons utilisées au cours de ce travail.

Pour faire ce choix, parmi les nombreuses méthodes décrites, nous avons tenu compte des considérations suivantes :

— les techniques utilisées sont les applications découlant chacune des méthodes générales de dosage de l'amylase citées précédemment ;

— étant donné l'importance et la qualité des travaux consacrés par SOMOGYI au dosage de l'amylase, nous avons considéré que la méthode saccharogénique décrite par cet auteur, pourrait nous servir de méthode de référence ;

— la méthode de DORCHE, ROULLET, DEBAT est utilisée couramment dans les hôpitaux lyonnais, et de ce fait, nous avons l'habitude de la pratiquer ;

— la méthode de SMITH et ROE est une technique iodométrique classique assez fréquemment employée ;

— la mise au point et l'étude de la méthode amyloclastique de SOMOGYI a été à l'origine de ce travail.

A) METHODE SACCHAROGENIQUE DE SOMOGYI

La méthode saccharogénique de SOMOGYI a fait l'objet de nombreuses modifications, dont certaines ont été réalisées par l'auteur lui-même.

Celle que nous décrivons, comporte une défécation à l'acide tungstique et au sulfate de cuivre. En effet, nous avons commencé ainsi notre travail, et nous n'avons pas voulu changer de méthode, bien que nous nous soyons rendu compte que la technique à l'hydrate de zinc pouvait également convenir. Par ailleurs, pour des raisons de commodité, nous avons préféré effectuer le dosage des sucres par la méthode de FOLIN et WU, ainsi que le font certains auteurs (YOUNG). Nous avons vérifié que les résultats obtenus étaient superposables.

1) Réactifs.

— Substrat tamponné :

Le mode de préparation du substrat fera l'objet d'un chapitre particulier.

— **Solution de tungstate de sodium à 6 %.**

— **Solution de sulfate de cuivre à 5 %.**

— **Solution cupro-alkaline de FOLIN et WU :**

Dans une fiole jaugée d'un litre contenant 400 ml d'eau distillée, faire dissoudre 40 g de carbonate de soude anhydre, 7,5 g d'acide tartrique et 4,5 g de sulfate de cuivre. Compléter au litre avec de l'eau distillée.

— **Solution phospho-molybdique de FOLIN et WU :**

Dans un ballon, mettre : 35 g d'acide molybdique et 5 g de tungstate de sodium. Ajouter 200 ml de soude à 10 % et 200 ml d'eau distillée. Porter à l'ébullition pendant 20 à 40 minutes pour éliminer la plus grande quantité possible d'ammoniaque. Ajouter alors de l'eau distillée pour obtenir un volume total d'environ 350 ml. Mettre ensuite 125 ml d'acide phosphorique à 85 %. Transvaser dans une fiole jaugée de 500 ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

— **Solution stock de glucose (10 g par litre) :**

Dissoudre 1 g de glucose pur anhydre dans 100 ml d'une solution d'acide benzoïque à 0,25 %.

— **Solution étalon de glucose :**

Solution de travail correspondant à 2 g de glucose par litre. Mettre 2 ml de solution stock dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

(Ces quantités tiennent compte de la dilution 1/10 des sérums à doser).

2) Mode opératoire :

- a) Dans deux tubes à essai, mesurer 5 ml d'empois d'amidon tamponné. Les porter au bain-marie à 40° pendant 5 minutes.

- b) Dans un des deux tubes, mesurer 1 ml de sérum (dosage), dans l'autre, ajouter 1 ml d'eau distillée (témoin amidon).
- c) A partir de ce moment, laisser les tubes au bain-marie à 40° pendant 30 minutes exactement.
- d) Ajouter alors dans chaque tube, 2 ml de solution de sulfate de cuivre et 2 ml de solution de tungstate de sodium.
- e) Mélanger par retournements, laisser au repos pendant environ 10 minutes, puis filtrer.
- f) Dans un troisième tube (témoin sérum), mesurer 1 ml de sérum, 5 ml d'eau distillée, 2 ml de solution de sulfate de cuivre, et 2 ml de solution de tungstate. Agiter. Filtrer.
- g) Doser le glucose.

Pour ceci, procéder de la manière suivante :

— Dans 3 tubes de FOLIN et WU jaugés à 25 ml, mesurer 1 ml de chacun des 3 filtrats (dosage, témoin amidon, témoin sérum).

— Dans un quatrième tube, mesurer 1 ml de solution étalon de glucose (étalon).

— Dans un cinquième tube, mesurer 2 ml d'eau distillée (blanc).

Dans chaque tube, ajouter :

— 1 ml d'eau distillée (sauf dans le « blanc ») ;

— 2 ml de solution cupro-alkaline de FOLIN et WU.

Porter tous les tubes au bain-marie bouillant pendant 8 minutes. Les refroidir ensuite sous un courant d'eau froide. Ajouter dans chacun, 2 ml de réactif phosphotungstique de FOLIN et WU ; bien mélanger.

Laisser reposer environ 3 minutes puis compléter à 25 ml par de l'eau distillée. Agiter.

Après 10 minutes, colorimétrer à 420 m μ , en faisant le 100 % de transmission sur le tube « blanc ».

3) Calcul des résultats :

— Déterminer le taux de glucose « N » du sérum mis à incuber en présence de l'empois d'amidon

$$\frac{\text{D.O. du tube « Dosage »} - \text{D.O. du tube « témoin amidon »}}{\text{D.O. de l'étalon}} \times 200$$

= N mg de glucose pour 100 ml.

— Déterminer le taux de glucose « n » du sérum non incubé

$$\frac{\text{D.O. du « témoin sérum »}}{\text{D.O. « étalon »}} \times 200 = n \text{ mg de glucose pour 100 ml.}$$

— Calculer l'activité amylasique du sérum à doser

$$N - n = \text{Unités SOMOGYI pour 100 ml de sérum}$$

B. — METHODE SACCHAROGENIQUE DE DORCHE ET COLL.

1) Réactifs :

— **Substrat amidon :**

Même remarque que pour la technique saccharogénique de SOMOGYI.

— **Solution de CINa acide :**

Préparer la solution suivante :

CINa	10 g
ClH N/10	3 ml
Eau distillée	100 ml

— **Solution d'hydroxyde de sodium environ N/2.**

— **Solution à 10 % de sulfate de zinc :**

La solution filtrée devra être ajustée sur la solution de soude en présence de phénolphtaléine.

— **Solution d'OST-DORCHE :**.....

Solution A

$\text{CO}_3 \text{ K}_2$	15 g
$\text{CO}_3 \text{ HK}$	12 g
Eau distillée, q.s.p.	80 ml

Solution B

$\text{SO}_4 \text{ Cu}$	1,40 g
Eau distillée, q.s.p.	20 ml

Mélanger les deux solutions en agitant vigoureusement.

— **Solution de NELSON modifiée :**

Solution A

Molybdate d'ammonium	25 g
Eau distillée, q.s.p.	450 ml
Acide sulfurique concentré	100 ml

Faire dissoudre le molybdate dans l'eau puis ajouter l'acide sulfurique par petites portions tout en agitant. Eviter que le mélange ne s'échauffe trop.

Solution B

Arséniate de sodium	3 g
Eau distillée, q.s.p.	25 ml

Mélanger les deux solutions. Laisser 48 heures à l'étuve à 37°.

Filtrer.

— **Solution exactement titrée de MnO_4K N/400 :**

Cette solution se prépare extemporanément à partir de MnO_4K N/10 ou N/4.

2) Mode opératoire :

— Dans un premier tube, mesurer 5 ml de substrat ; 2 ml de solution de ClNa acide ; 1 ml d'eau distillée (témoin amidon).

— Dans un deuxième tube, mesurer 2 ml de solution chlorurée acide et 5 ml d'eau distillée (témoin sérum).

— Dans un troisième tube, mesurer 5 ml de substrat et 2 ml de solution chlorurée acide (dosage).

— Porter les trois tubes au bain-marie à 37° pendant 5 minutes environ, puis ajouter dans les deuxième et troisième tubes, 1 ml de sérum.

Laisser les tubes au bain-marie à 37° pendant 30 minutes exactement.

Après cette période, retirer les tubes du bain-marie et doser le glucose. Pour ceci :

— Ajouter dans chaque tube 1 ml de sulfate de zinc et 1 ml de solution de soude N/2. Bien mélanger. Filtrer.

— Mesurer dans trois tubes à essai, 2 ml de chacun des filtrats. Y ajouter 1 ml de solution d'OST-DORCHE. Homogénéiser.

— Porter les trois tubes au bain-marie bouillant pendant 10 minutes.

— Refroidir les tubes sous un courant d'eau et y ajouter avec précaution 1 ml de solution de NELSON modifiée. Mélanger, laisser reposer 15 minutes en agitant de temps en temps.

— Titrer par MnO_4K N/400 jusqu'à décoloration du complexe bleu formé.

Si la quantité de MnO_4K N/400 utilisée pour le tube « dosage » dépasse 20 ml, recommencer sur une dilution du sérum.

3) Calcul des résultats :

Soit n_1 , n_2 , n_3 les volumes de MnO_4K N/400 utilisés respectivement pour les tubes « témoin amidon », « témoin sérum » et « dosage ».

Si le substrat est correctement préparé, n_1 est nul ou très faible.

Calculer pour chaque tube, la quantité de glucose X rapportée à 100 ml par la formule suivante :

$$X \text{ mg} = (n + 1) 21,8$$

L'activité amylasique cherchée, exprimée en unités SOMOGYI (37°) est égale à : $X_3 - (X_1 + X_2)$.

Remarque :

— Pour que la défécation soit correcte, les solutions de sulfate de zinc et d'hydroxyde de sodium doivent être exactement ajustées l'une sur l'autre.

— L'addition du réactif de NELSON modifié, provoque souvent l'apparition d'une mousse abondante par suite du dégagement de CO_2 . On peut empêcher sa formation par addition d'une trace d'antimousse.

C. — METHODE IODOMETRIQUE DE SMITH ET ROE (Modification de P.V. FERRO [27])

La méthode que nous décrivons est une modification de la technique originale de SMITH et ROE. L'auteur de cette modification est P.V. FERRO. Les points de divergence sont notés ci-après.

	Technique originale	Technique modifiée
Prise d'essai	1 ml	0,2 ml
Quantité d'amidon mise en réaction	60 mg	4 mg
Temps d'incubation	30 minutes	10 minutes
Concentration de la solution d'iode utilisée	1,5 %	N/50

1) **Réactifs :**

— **Substrat amidon :**

Même remarque que pour la technique saccharogénique de SOMOGYI.

— **Solution d'iode N/50 :**

— **Hydroxyde de sodium N/10.**

2) **Mode opératoire :**

- a) Mesurer 2 ml de substrat dans 2 grands tubes à essai (tube témoin et tube réaction).
- b) Porter les deux tubes à essai au bain-marie à 37° pendant 5 minutes environ.
- c) Dans un des tubes (tube réaction), mettre 0,2 ml du sérum à étudier.
- d) Laisser les deux tubes au bain-marie à 37° pendant 10 minutes exactement.
- e) Après le temps d'incubation, ajouter dans les deux tubes 3 ml d'hydroxyde de sodium N/10.
- f) Ajouter 0,2 ml de sérum dans le tube témoin. Bien mélanger.
- g) Dans les deux tubes, prélever 1 ml et les porter dans deux fioles jaugées de 50 ml, contenant chacune 40 ml d'eau distillée et 1 ml d'iode N/10.
- h) Compléter à 50 ml avec de l'eau distillée. Bien mélanger.
- i) Colorimétrer à 620 m μ en réglant le 100 % de transmission sur de l'eau distillée.

3) **Calculs :**

$$\frac{\text{D.O. du tube témoin} - \text{D.O. du tube réaction}}{\text{D.O. du tube témoin}} \times K = \text{unités}$$

d'amyrase dans le sérum à doser.

Le coefficient K est voisin de 600. Il varie légèrement suivant les préparations de substrat.

Remarques :

Cette méthode, malgré sa simplicité apparente, présente un inconvénient important. Les résultats obtenus dépendent étroitement de la nature et de la qualité du substrat utilisé. Il convient donc de déterminer au préalable, pour chaque lot de substrat, le coefficient K en faisant plusieurs dosages sur des sérums dont on connaît le titre en amylase.

Les résultats obtenus par la méthode modifiée de P.V. FERRO sont exprimés en unités directement comparables aux unités SOMOGYI (méthode saccharogénique effectuée à 40°).

D. — METHODE AMYLOCLASTIQUE DE SOMOGYI

1) Réactifs :

— Substrat tamponné :

Même remarque que pour la technique saccharogénique de SOMOGYI.

— Solution d'iode N/500 :

Préparer la solution suivante :

Iode N/10	10 ml
Iodure de potassium	10 g
Eau distillée, q.s.p.	500 ml

2) Mode opératoire :

— Mesurer 4 ml de substrat tamponné dans un tube à essai. Le porter au bain-marie à 40° pendant 5 minutes environ (équilibre des températures).

— Disposer sur un portoir une dizaine de tubes à hémolyse. Mesurer dans chacun 0,5 ml de la solution d'iode N/500.

— Introduire 1 ml du sérum à doser dans le tube de substrat placé au bain-marie. Déclencher simultanément un chronomètre. Agiter pour mélanger.

— Au bout de 6 minutes, prélever 0,5 ml du mélange amidon-sérum et les mettre dans un des tubes à hémolyse contenant la solution d'iode. Noter la teinte. Procéder ensuite de la même manière, à intervalles réguliers, de minute en minute, par exemple. Le chronomètre est arrêté au moment où la coloration a une teinte brun rouge (érythrodextrines). Avec un peu d'expérience, l'appréciation de la fin de la réaction est relativement facile.

Si, après un temps d'incubation de 6 minutes, la coloration est encore bleue foncée, il est préférable d'attendre 2 à 3 minutes avant de faire un nouveau prélèvement. Après 14 minutes, un écart de 2 à 3 minutes dans l'appréciation du virage n'affecte que très peu les résultats qui restent d'une précision satisfaisante.

Si, au contraire, au bout de 6 minutes, la coloration obtenue est jaune paille et a donc dépassé la zone de virage, c'est que l'activité amylasique du sérum est supérieure à 300 unités. Pour la déterminer avec plus d'exactitude, il convient de faire un nouveau dosage sur un échantillon de sérum dilué. Pour ceci, il est nécessaire de modifier la quantité d'iode employée, car la netteté du virage dépend du rapport iode/protéines.

Pour réaliser la dilution du sérum, on procède alors de la manière suivante :

Sérum	Amidon	Mélange sérum-amidon	Iode
1 ml	4 ml	0,5 ml	0,5 ml
0,5 ml	4 ml	0,5 ml	0,3 ml
0,2 ml	4 ml	0,5 ml	0,15 ml

Pour les calculs, ramener le résultat à 1 ml en tenant compte de la prise d'essai.

Dans le cas d'un sérum à très haut titre amylasique, la lecture peut être faite au bout de 3 à 4 minutes, ce qui représente un gain de temps très appréciable lorsque l'examen est demandé en urgence.

3) Calculs :

Le temps t au bout duquel on obtient le virage est transformé en unités SOMOGYI.

Ce temps t est inversement proportionnel à l'activité de l'enzyme ($\frac{1}{t}$ est donc directement proportionnel à cette activité).

Le titre saccharogénique de l'amylase A , exprimé en unités saccharogéniques de SOMOGYI, est aussi directement proportionnel à l'activité de l'enzyme, d'où, il s'en suit que le rapport $A \times \frac{1}{t}$ a une valeur

constante K , d'où $K = At$ et $A = \frac{K}{t}$

A et t ont été déterminés expérimentalement par SOMOGYI à l'aide des deux méthodes décrites par lui. K a été trouvé égal à 1800

pour les sérums humains. Donc $\frac{1800}{t \text{ (minutes)}} = \text{unités d'amylase}$

pour 100 ml exprimés en unités SOMOGYI.

Le tableau I ci-après permet de calculer directement le titre du sérum en fonction du temps nécessaire au virage. On peut toutefois, avec un peu d'expérience, apprécier aisément le virage à une demi-minute près.

TABLEAU I

Temps exprimé en minutes	Unités d'amylase (SOMOGYI)	Temps exprimé en minutes	Unités d'amylase (SOMOGYI)
3	600	22	82
4	450	23	78
5	350	24	75
6	300	25	72
7	257	26	69
8	225	27	66
9	200	28	64
10	180	29	62
11	164	30	60
12	150	31	58
13	138	32	56
14	129	33	54
15	120	34	53
16	113	35	51
17	106	36	50
18	100	37	49
19	95	38	47
20	90	39	46
21	86	40	45

Remarques :

— Le coefficient 1800 ne peut être utilisé que si l'on suit rigoureusement le mode opératoire décrit par SOMOGYI.

— D'après le même auteur, la méthode est susceptible de donner de bons résultats pour l'urine et la salive, mais convient mal aux dosages effectués sur des liquides colorés tels que la bile ou les sérums lipémiques ou ictériques.

La lecture du terme de la réaction serait plus aisée si elle était effectuée devant une source lumineuse. En fait, et avec un peu d'entraînement, on apprécie très bien le virage à la lumière du jour.

III. — PREPARATION ET CHOIX DES SUBSTRATS

A. — PREPARATION DU SUBSTRAT

ADAPTE A LA METHODE SACCHAROGENIQUE DE SOMOGYI

1) Technique de préparation selon SOMOGYI :

Cette technique comprend deux temps :

- purification de l'amidon,
- préparation de l'empois.

a) Purification de l'amidon.

Dans un b cher de 2 litres, mettre environ 1.800 ml de soude 0,25 %. Faire chauffer à 50-55 . Arrêter le chauffage puis ajouter en agitant à l'aide d'un agitateur mécanique, 200 g d'amidon de maïs. Poursuivre l'agitation pendant 1 à 2 heures. Laisser la préparation au repos pendant la nuit pour laisser déposer l'amidon.  liminer le surnageant teinté en jaune et le remplacer par de l'eau distillée. Remettre l'amidon en suspension, agiter à nouveau et laisser décanter la nuit. Procéder ainsi à deux nouveaux lavages à l'eau distillée, puis recueillir l'amidon et le laisser sécher à la température du laboratoire.

b) Préparation de l'empois.

Préparer la solution tampon suivante :

PO_4HK_2	2,25 g
$\text{PO}_4\text{HNa}_212\text{H}_2\text{O}$	6 g
ClNa	2,5 g
F Na	2 g
Parahydroxybenzoate de propyle (Nipasol)	0,3 g
Eau distillée, q.s.p.	1000 ml

Porter à l'ébullition pour favoriser la dissolution du nipasol. Après 2 ou 3 jours, la solution est filtrée pour éliminer le nipasol en excès. Le pH est voisin de 6,8.

Mettre en suspension 3 g d'amidon purifié dans 20 ml de solution tampon. Y ajouter en agitant vigoureusement 180 ml de mélange tampon bouillant. Laisser refroidir.

La préparation est alors prête à l'emploi. Son pH est voisin de 7,0.

2) Commentaires et travail personnel :

L'exécution de la technique décrite ci-dessus ne comporte pas de difficultés particulières. Nous avons utilisé pour préparer ce type de substrat, un amidon de maïs du commerce : la « Maïzena ». Nous avons cependant voulu vérifier quelques points particuliers :

a) Vérification de l'influence de la purification de l'amidon.

La purification de l'amidon étant la partie la plus fastidieuse de l'opération, nous avons voulu voir si elle était susceptible de modifier nettement le résultat final. Pour ceci, deux empois ont été préparés, l'un avec un amidon de maïs (Maïzena) purifié, l'autre, avec le même amidon non purifié. Des dosages effectués par la méthode Saccharogénique avec les deux empois sur un même sérum, nous ont donné des résultats sensiblement identiques :

Amidon brut	162 U. SOMOGYI
Amidon purifié	165 U. SOMOGYI

(Ces résultats correspondent chacun à une moyenne de 6 dosages.)

La purification de l'amidon n'apporte donc pas d'amélioration sensible et ne paraît pas indispensable. Nous l'avons cependant pratiquée de manière systématique pour préparer les substrats utilisés au cours de ce travail.

Il faut noter que ni le substrat purifié, ni le substrat non purifié ne renfermaient de sucres réducteurs.

b) Vérification de l'influence de l'origine de l'amidon.

Ayant précédemment utilisé avec satisfaction, pour le dosage de l'amyase un amidon soluble selon ZULKOWSKY, l'amidon « MERCK 1237 », nous avons essayé de le substituer à l'amidon de maïs.

Pour ceci, nous avons pratiqué avec les 2 amidons des dosages d'amylase sur un pool de sérums lyophilisés et sur un sérum de référence du commerce (taux théorique : 250 U). Les résultats obtenus (moyenne de 6 dosages) ont été les suivants :

— Pool de sérums lyophilisés :

Amidon de maïs purifié	158 U. SOMOGYI
Amidon MERCK N° 1237 ..	145 U. SOMOGYI

— Sérum lyophilisé du commerce :

Amidon de maïs purifié	267 U. SOMOGYI
Amidon MERCK N° 1237 ..	260 U. SOMOGYI

Il ressort de cet essai que :

1° les chiffres obtenus avec l'amidon de maïs ou avec l'amidon soluble sont très proches.

2° A l'avantage de l'amidon de maïs, il faut noter cependant :

— l'obtention de filtrats beaucoup plus clairs lors de la défécation pour le dosage des sucres ;

— la D.O. du témoin « amidon soluble » correspond à 68 mg % de glucose : l'amidon de maïs purifié n'a pratiquement pas de pouvoir réducteur.

Pour ces raisons, nous avons donné notre préférence à l'amidon de maïs.

c) Essai de préparation d'un amidon tamponné prêt à l'emploi.

La préparation extemporanée de la solution tampon pour l'obtention de l'empois d'amidon est une opération relativement longue. Nous nous sommes demandé s'il était possible de mélanger au préalable les sels à l'amidon. Nous avons préparé le mélange suivant :

Amidon de maïs purifié	15	g
PO ₄ H ₂ K	2,25	g
PO ₄ H Na ₂ , 12 H ₂ O	6	g
Cl Na	2,5	g
F Na	2	g

Le mélange a été réparti à raison de 1,39 g dans des flacons de 10 ml. Au moment de l'emploi, le contenu du flacon est repris par 5 ml d'eau distillée puis versé dans 45 ml d'eau distillée bouillante. Le nipasol a été supprimé du fait de son insolubilité. De plus, la quantité d'empois préparée chaque fois étant minime, et pouvant être jetée après emploi, il ne semblait pas nécessaire d'y ajouter cet antiseptique.

Les résultats obtenus avec ce substrat sur un même pool de sérum lyophilisé sont superposables à ceux obtenus avec un empois identique préparé extemporanément. D'autre part, la conservation de cette préparation paraît satisfaisante comme le montre le tableau II.

TABLEAU II

Date des dosages	Résultats obtenus avec un substrat préparé extemporanément	Résultats obtenus avec le mélange de poudre amidon-tampon
15 novembre 1963	139	139
13 décembre 1963	145	145
15 janvier 1964	148	152
5 mars 1964	145	153
14 avril 1964	146	152
2 juin 1964	144	149
28 septembre 1964	141	141
23 octobre 1964	154	154

Cette manière de procéder, qui à notre avis simplifie la préparation de l'empois d'amidon, paraît également susceptible (car il est possible de préparer « à l'avance » une quantité relativement importante du mélange tampon-amidon) de conduire à une meilleure standardisation des résultats.

d) Etude de la conservation du substrat sous la forme liquide.

Ayant montré que ce mélange amidon-tampon se conservait très bien, nous avons fait une étude similaire sur ce substrat après remise en solution.

Des essais comparatifs ont été pratiqués sur un sérum lyophilisé avec le substrat conservé au réfrigérateur et avec un substrat préparé extemporanément. Les résultats figurent dans le tableau III.

TABLEAU III

Dates des dosages	Substrat conservé à + 4°	Substrat préparé extemporanément
1 ^{er} jour de la préparation	150	
2 ^e jour de la préparation	142	139
3 ^e jour de la préparation	141	144
4 ^e jour de la préparation	139	139
8 ^e jour de la préparation	192	145

Les résultats obtenus avec l'empois d'amidon conservé à + 4° restent très comparables pendant 4 jours. Au huitième jour, on note une augmentation sensible des chiffres obtenus. Cette variation peut être mise sur le compte d'une contamination bactérienne du substrat. Dans la pratique, il paraît préférable de ne pas dépasser un délai de 48 heures de conservation.

Conclusions.

Ces essais ont montré que dans le cadre de la méthode saccharogénique de Somogyi :

— la purification de l'amidon ne paraissait pas, compte tenu de la matière première employée, absolument indispensable.

— l'utilisation de l'amidon de maïs était préférable à celle d'un amidon soluble.

— la préparation d'un mélange stock « amidon-tampon » paraissait susceptible de simplifier la préparation de l'empois, et d'assurer de ce fait une meilleure standardisation des résultats.

— un empois d'amidon préparé dans ces conditions pouvait après remise en solution se conserver pendant environ 4 jours à + 4°.

A la suite de ces constatations, nous avons effectué les dosages de l'amylase par la méthode saccharogénique de SOMOGYI, en préparant pour chaque série de dosage un empois à partir d'un mélange tampon-amidon de maïs purifié.

B. — PREPARATION DU SUBSTRAT

ADAPTE A LA METHODE AMYLOCLASTIQUE DE SOMOGYI

1) **Technique de préparation selon SOMOGYI :**

L'amidon utilisé est de l'amidon de maïs.

a) Purification de l'amidon de maïs.

Est analogue à celle effectuée pour la préparation du substrat « saccharogénique ».

b) Préparation du substrat.

— Préparation de la solution tampon de pH 6,8.

Elle a la même composition que celle utilisée pour la préparation du substrat saccharogénique.

— Préparation de la suspension « stock » d'amidon tamponné.

Peser 5 g d'amidon de maïs. Les mettre dans un bécher de 400 ml. Ajouter 25 ml de solution tampon préalablement portée à 55°. Mettre l'amidon en suspension, puis verser en agitant constamment (au moyen d'un agitateur magnétique, par exemple) 225 ml de tampon bouillant. Couvrir le bécher, et laisser la suspension au repos pendant au moins deux jours à la température du laboratoire. La suspension se sépare en deux couches, l'une étant constituée par un sédiment d'aspect gélatineux, l'autre par un surnageant légèrement opalescent. Ce dernier sera siphonné et constituera la suspension stock.

— Titrage de la suspension « stock ».

Mettre 5 ml de suspension dans un tube de 25 × 200. Ajouter 5 ml d'HCl N/I. Porter le tube, couvert d'un petit b cher au bain-marie bouillant pendant 3 heures. Refroidir alors, sous un courant d'eau froide et neutraliser par NaOH N/I en présence de phénolphtaléine. Transvaser le contenu du tube dans une fiole jaugée de 50 ml, rincer et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée. Bien mélanger. Titrer le glucose en prenant pour référence une solution de glucose à 150 mg pour 100 ml.

La quantité de glucose trouvée multipliée par 0,9 donne la concentration en amidon de la solution.

— Préparation de la suspension d'amidon à 75 mg %.

Diluer la suspension stock avec du tampon pour amener sa concentration en amidon à 75 mg %.

Par exemple, si la concentration trouvée est de 328 mg %, on ajoutera à 75 ml de suspension stock $328 - 75 = 253$ ml de tampon.

Ce substrat à 75 mg % doit être préparé extemporanément.

2) Commentaires et travail personnel.

a) Essai du substrat préparé dans les conditions décrites par SOMOGYI.

Nous avons préparé un substrat de la manière décrite ci-dessus et ajusté à 75 mg %. Des dosages ont été effectués par les méthodes saccharogéniques et amyloclastiques de SOMOGYI sur différents sérums. Dans tous les cas, les résultats obtenus par la méthode amyloclastique étaient plus élevés. Une bonne corrélation était obtenue entre les deux méthodes, à la condition d'ajuster le titre de la solution de travail à 80-85 mg % d'amidon au lieu de 75 mg %. Cette constatation nous a conduit à pratiquer divers essais.

b) Remarques concernant la technique de préparation du substrat selon SOMOGYI.

Il nous a semblé que l'on pourrait apporter quelques améliorations à la préparation du substrat amyloclastique telle qu'elle a été décrite par SOMOGYI.

— La décantation de l'amidon pour l'obtention de la solution stock n'est pas toujours parfaite et les solutions obtenues sont très opalescentes, ce qui peut gêner le dosage. Ce fait avait sans doute été observé par A.-E. REIFF et C. NABSETH [68] qui préconisent après une période de décantation de 48 heures, une centrifugation à 2.500 g, à basse température (10°). Dans ces conditions, les surnageants obtenus sont clairs.

— La conservation de la solution stock est limitée, ce qui, étant donné sa difficulté de préparation, est un inconvénient sérieux. Pour A.-E. REIFF les résultats obtenus après 4 jours de conservation, sont de 6 à 12 % plus faibles et 50 % plus faibles après 17 jours de conservation.

Nous avons pensé obtenir de meilleurs résultats en stabilisant les substrats par lyophilisation.

— Le dosage est effectué à 40°.

Du point de vue théorique, cette manière de procéder est la bonne, puisque c'est la température optima d'action de l'amylase. Malheureusement, l'expérience a montré que la première préoccupation de la plupart des auteurs était d'adapter à 37° les techniques comportant un temps d'incubation à 40°. A. REIFF n'échappe pas à la règle et considère que le coefficient de 1.800 obtenu par SOMOGYI doit être remplacé par le coefficient 2.000 lorsque la méthode amyloclastique est pratiquée à 37°.

Nous avons pensé qu'il était possible de conserver le coefficient 1.800 en travaillant à 37°, ceci en modifiant légèrement le titre du substrat.

Ces considérations nous ont amené à préconiser pour la préparation du substrat, la technique suivante :

c) Technique personnelle de préparation du substrat amidon pour la méthode amyloclastique.

— Vérification de l'amidon de maïs.

Nous procédons de la manière suivante :

— réalisation d'un lot homogène par mélange d'une quantité importante d'amidon ;

— purification de l'amidon ;

— vérification de l'absence de sucres réducteurs ;

— pré-titrage de l'amidon : Des essais successifs nous ont montré que, pour une température d'incubation de 37°, le coefficient 1.800 pourrait être utilisé si l'on diluait les solutions stock à 90, 95 ou 100 mg % suivant les lots d'amidon de départ.

On choisit ce titre en réalisant 3 préparations pilotes respectivement à 90, 95, 100 mg pour 100 ml et en comparant les résultats obtenus par la méthode saccharogénique de SOMOGYI à 40° et par la méthode amyloclastique à 37° sur plusieurs sérums.

Ce titre étant déterminé, l'amidon de maïs de départ pourra alors servir à plusieurs préparations.

— Préparation de la solution tampon.

La formule de la solution tampon utilisée est la même que celle préconisée par SOMOGYI mais elle est préparée à une concentration double, car elle sera diluée au 1/2 après lyophilisation.

— Préparation de la solution stock d'amidon tamponnée.

La technique de préparation est celle de SOMOGYI mais après 2 jours de décantation, on termine par une centrifugation à 2.500 g, à + 10°. Si le surnageant reste opalescent il est filtré sur papier filtre dur.

— Titrage de la solution stock.

Le substrat qui sera également dilué au 1/2 après lyophilisation, est préparé à une concentration double de celle déterminée par le pré-titrage : par exemple, si le pré-titrage de l'amidon a donné un titre de 90 mg, la solution stock sera diluée à 180 mg.

— Lyophilisation.

Le substrat est réparti à raison de 4,5 ml dans des flacons de 10 ml, puis lyophilisé. Après lyophilisation, le contenu des flacons devrait être repris théoriquement par 9 ml d'eau distillée. D'une manière générale, ces substrats se remettent bien en solution.

— Standardisation de l'amidon lyophilisé.

La lyophilisation étant susceptible de modifier quelque peu l'activité du substrat, il faut déterminer la quantité exacte d'eau distillée qu'il faut rajouter pour obtenir sur des sérums différents des titres équivalents à ceux donnés par la technique saccharogénique de SOMOGYI en utilisant le coefficient 1.800.

Sur 10 préparations, effectuées, cette quantité d'eau distillée a toujours été comprise entre 8,4 et 9 ml (9 ml étant la quantité théorique). Ces variations modifient peu la force ionique du tampon.

d) Essais pratiqués sur le substrat amyloclastique lyophilisé.

α) Vérification de l'homogénéité.

Des essais ont été pratiqués sur un sérum frais afin de vérifier que l'activité du substrat était bien la même dans tous les flacons. Les résultats obtenus sur deux lots différents sont consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

LOT 03310		LOT 04310	
Flacons	Résultats	Flacons	Résultats
1	129	1	129
2	138	2	129
3	138	3	120
4	138	4	129
5	129	5	129
6	129	6	129
7	129	7	120
8	129	8	129
9	129	9	129
10	129	10	129

Tous les dosages ont été effectués sur le même sérum. La moyenne des chiffres est de 129, les chiffres extrêmes de 120 et 138, soit une variation de 129 ± 9 unités.

β) Vérification des résultats obtenus avec différentes préparations de substrat sur un même lot de sérum lyophilisé titrant 225 U. par la méthode saccharogénique de SOMOGYI.

Lot 01310	215 Unités
Lot 02310	218 Unités
Lot 03310	218 Unités
Lot 04310	219 Unités

Les résultats obtenus apparaissent très reproductibles pour des lots de préparation différents et très proches de ceux obtenus par la méthode saccharogénique de SOMOGYI.

γ) Conservation du substrat à l'état lyophilisé.

Ces essais ont été effectués sur des sérums lyophilisés. Nous donnons dans les tableaux V et VI les résultats obtenus sur deux lots de préparation différents.

TABLEAU V

Substrat lot 01310 : 1 flacon est repris par 8,4 ml
d'eau distillée - sérum lyophilisé 0205

Dates	Conservation à 37°	Conservation à la température du laboratoire	Conservation à + 4°
10-1-1963 (départ)		257 (6 min 30 sec)	
14-2-1963	300 (6 min)	276 (6 min 30 sec)	276 (6 min 30 sec)
28-3-1963	257 (7 min)	257 (7 min)	257 (7 min)
17-5-1963	257 (7 min)	276 (6 min 30 sec)	276 (6 min 30 sec)
19-6-1963	276 (6 min 30 sec)	300 (6 min)	276 (6 min 30 sec)
19-7-1963	300 (6 min)	300 (6 min)	300 (6 min)
6-9-1963	300 (6 min)	276 (6 min 30 sec)	276 (6 min 30 sec)
26-10-1963	276 (6 min 30 sec)	276 (6 min 30 sec)	276 (6 min 30 sec)
22-11-1963	276 (6 min 30 sec)	257 (7 min)	257 (7 min)
29-1-1964	300 (6 min)	300 (6 min)	278 (6 min 30 sec)

TABLEAU VI

Substrat 01303 : 1 flacon est repris par 8,6 ml
d'eau distillée - sérum lyophilisé 0206

Dates	Conservation à 37°	Conservation à la température du laboratoire	Conservation à + 4°
11-3-1963 (départ)		218 U	
28-3-1963	200	200	190
17-4-1963	200	217	200
17-5-1963	180	190	190
19-6-1963	190	190	210
26-9-1963	220	200	200
24-10-1963	220	—	210
21-11-1963	200	—	190
26-12-1963	220	—	210

La conservation paraît bonne quelles que soient les conditions de conservation.

Conclusions.

La stabilité du substrat à l'état lyophilisé est excellente. Il semble qu'il puisse être conservé sous cette forme pendant plusieurs années, sans modifications.

δ) Conservation du substrat amyloclastique après mise en solution.

— Stabilité.

Après remise en solution, le substrat est légèrement louche, mais homogène. Conservée à la température du laboratoire, la préparation ne commence à sédimenter qu'après 24 heures.

A + 4°, un précipité apparaît après 18 heures de conservation.

La conservation, à la température du laboratoire, paraît préférable.

— Activité.

Un substrat conservé pendant une semaine à la température du laboratoire, a donné des résultats pratiquement analogues à ceux trouvés immédiatement après la remise en solution. Cependant, il s'était formé un sédiment assez difficile à remettre en suspension.

Malgré ces résultats favorables, nous pensons qu'après remise en solution le substrat ne devrait pas être conservé plus de 24 à 48 heures à la température du laboratoire. En effet, des contaminations microbiennes sont toujours possibles. D'autre part, bien que nous ne l'ayons pas personnellement constaté, une baisse d'activité (de 6 à 12 %) peut, d'après A. REIFF, se produire en 3 ou 4 jours.

C. — PREPARATION DU SUBSTRAT
POUR LA METHODE SACCHAROGENIQUE DE DORCHE ET COLL.

1) **Technique de préparation :**

a) **Purification de l'amidon.**

Mettre en suspension 50 g d'amidon de maïs ou de riz dans environ 500 ml d'acide chlorhydrique N/100.

Agiter de temps en temps pendant une heure. Laisser déposer l'amidon. Décanter le liquide surnageant. Laver deux fois de suite l'amidon dans les mêmes conditions avec une solution de chlorure de sodium à 5 %. Recueillir l'amidon sur un filtre puis le laisser sécher à la température du laboratoire.

b) **Préparation de l'empois.**

Délayer au mortier 1,5 g d'amidon purifié dans 5 ml d'eau distillée. Verser cette suspension dans 90 ml d'eau portée à l'ébullition dans un erlenmeyer. Rincer le mortier avec 5 ml d'eau. Laisser bouillir une minute, puis placer l'erlenmeyer au-dessus d'un bain de vapeur, maintenant une température d'environ 40°.

2) Commentaires :

Nous avons utilisé pour faire cette préparation de l'amidon de maïs (Maïzena). L'empois était renouvelé pour chaque série de dosage.

Le substrat saccharogénique de SOMOGYI ne peut être utilisé pour cette technique, les phosphates qu'il contient gênent le dosage des sucres réducteurs, en réagissant avec la solution cupro-alkaline d'Ost-Dorche.

D. — SUBSTRAT UTILISE POUR LA METHODE IODOMETRIQUE DE SMITH ET ROE

Dans le cas de cette technique, notre but n'était pas d'essayer de préparer un substrat selon les indications de SMITH et ROE, mais de voir si les substrats que nous avons préparés pour les autres méthodes pouvaient également convenir. Les dosages ont été effectués par la modification de P.-V. FERRO (4 mg d'amidon en réaction au lieu de 60 dans la méthode originale).

D'emblée, nous avons dû éliminer les substrats où la structure du grain d'amidon est partiellement conservée. L'addition d'iode fait apparaître une coloration non homogène et par conséquent impossible à apprécier par photolorimétrie. Dans ce cas, se trouvent les substrats saccharogéniques de SOMOGYI, et de DORCHE et coll., préparés à partir d'amidon de maïs.

Un substrat saccharogénique préparé à partir d'amidon soluble selon ZULKOWSKI s'est également révélé inutilisable, car les colorations obtenues tiraient davantage sur le brun rouge que sur le violet. Des essais de dosage nous ont d'ailleurs donné des résultats très nettement différents de ceux obtenus par la méthode saccharogénique (452 U par la méthode iodométrique au lieu de 225).

Le substrat amyloclastique lyophilisé nous a donné par contre des résultats beaucoup plus valables. En effet, avec toutes les préparations essayées, les colorations obtenues étaient franchement violettes et parfaitement colorimétrables.

Sur le sérum mentionné plus haut titrant 225 Unités, nous avons obtenu avec le premier substrat essayé, un titre de 212 Unités. La concordance eût été parfaite si au lieu d'utiliser le coefficient 600, nous avions employé le coefficient 641.

Nous avons essayé ensuite différents substrats sur un même sérum dont le titre établi par la méthode saccharogénique était de 145 Unités. Les résultats obtenus figurent dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Substrat utilisé	Taux trouvé	Coefficient à utiliser pour avoir l'équivalence
01310	145	600
02310	118	750
03310	105	805
04410	135	640

Ces résultats montrent que les substrats amyloclastiques peuvent être utilisés par la méthode modifiée de SMITH et ROE, à la condition de les tester au préalable et de déterminer le coefficient permettant d'obtenir des résultats comparables à ceux de la méthode saccharogénique de SOMOGYI.

Par mesure de précaution, on pourrait éliminer les préparations dont le coefficient est trop différent de 600 (substrat 02310 et 03310), bien qu'il ne soit pas du tout certain que les résultats obtenus dans ces conditions ne soient pas valables.

Les dosages que nous avons effectués ensuite par la méthode de SMITH et ROE, l'ont été avec des substrats dont le coefficient était de 600 ± 100 .

IV. — ESSAIS DE PREPARATION D'UN SERUM DE REFERENCE

La comparaison des méthodes, l'étude de leur reproductibilité, l'étude de la stabilité des substrats, imposent que de nombreux dosages soient faits souvent en des temps très différents. L'emploi

d'un sérum de référence stable, paraît indispensable et nous avons essayé de préparer un tel sérum.

Le procédé qui à première vue paraissait le plus simple était de soumettre à la lyophilisation un mélange de sérums humains, et de s'assurer ensuite que la conservation en était satisfaisante.

Cette solution présente cependant deux inconvénients :

— Il n'est pas toujours facile de se procurer du sérum humain en quantité relativement importante.

— Il paraît préférable de posséder un sérum de référence dont le titre soit situé au-dessus de la normale.

C'est pourquoi, plutôt que de nous adresser tout de suite à un sérum humain, nous avons d'abord cherché si un sérum d'origine animale ne pourrait mieux convenir. Pour faire ce tri, nous avons utilisé en parallèle les méthodes saccharogéniques et amyloclastiques de SOMOGYI, sachant que la dernière adaptée par son auteur au dosage de l'amyase humaine pourrait, dans certains cas, ne pas convenir.

A. — DOSAGE DE L'AMYLASE DANS LE SERUM DE DIVERSES ESPECES ANIMALES

Pour obtenir une valeur moyenne de l'amyasémie des espèces animales que nous avons à notre disposition, nous avons effectué les dosages sur des mélanges à parties égales des sérums provenant de plusieurs individus de la même espèce.

Les résultats trouvés figurent dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Espèce animale	Nombre de sérums constituant le mélange	Résultats obtenus par la méthode saccharogénique	Résultats obtenus par la méthode amyloclastique
Homme	5	93	95
Singe (Babouin)	7	162	166
Cheval	5	711	Pas de décoloration du mélange iode-amidon
Bœuf	5	545	45
Mouton	5	182	Pas de décoloration du mélange iode-amidon
Lapin	5	344	220
Cobayes	200	2343	2137
Rat	5	3733	Pas de décoloration du mélange iode-amidon
Poussin	20	1314	257

On peut faire les constatations suivantes :

1° Si l'on tient compte uniquement de la méthode saccharogénique de SOMOGYI, il apparaît que les taux d'amylasémie sont extrêmement différents d'une espèce animale à l'autre.

2° On note une bonne corrélation entre les méthodes amyloclastiques et saccharogéniques pour trois espèces seulement : l'Homme, le Singe et le Cobaye.

3° Dans certaines espèces, bœuf, poussin, lapin, les résultats obtenus par la méthode amyloclastique sont beaucoup plus faibles bien que la lecture de la réaction soit relativement nette.

4° Avec le cheval, le mouton et le rat, le mélange Iode-amidon ne se décolore pas et tout se passe comme si le sérum étudié ne renfermait pas d'amylase. Ceci est tout particulièrement surprenant chez le rat qui donne par la méthode saccharogénique un titre très élevé (3.733 Unités).

En dehors des explications avancées à la page 31 de ce travail (Phosphorylases) nous n'avons pu trouver de raisons très satisfaisantes pour expliquer ces divergences.

B. — CHOIX ET PREPARATION D'UN SERUM DE REFERENCE

Dans les espèces animales étudiées, seules deux d'entre elles, le cobaye et le singe, paraissaient susceptibles de fournir un sérum pouvant être utilisé comme référence. Nous n'avons pas retenu le sérum de cobaye, car, du fait de sa concentration très élevée en amylase, il devait être fortement dilué, et ceci peut être un inconvénient avec la méthode amyloclastique, où, nous le savons, la concentration en protéines intervient dans le développement de la réaction.

Le sérum de singe, au contraire, convenait bien, puisque son taux d'amylase correspond sensiblement à la limite supérieure d'une amylasémie humaine normale. C'est, par conséquent, ce sérum que nous avons choisi.

Mode de préparation du sérum lyophilisé de singe.

On a recueilli séparément le sang provenant de 9 singes. Les sangs ont été centrifugés individuellement et les sérums mélangés. Après filtration stérilisante sur filtre SEITZ, le mélange de sérum est réparti à raison de 3,5 ml par flacon et soumis à la lyophilisation. Les dosages effectués avant et après lyophilisation nous ont donné les résultats suivants :

Avant lyophilisation :

Méthode saccharogénique	151 Unités
Méthode amyloclastique	150 Unités

Après lyophilisation :

Méthode saccharogénique	145 Unités
Méthode amyloclastique	138 Unités

Le sérum lyophilisé était conservé au réfrigérateur.

Nous avons fait ainsi plusieurs préparations de sérum de singe lyophilisé, dont certaines à partir du sang prélevé sur 1 ou 2 individus seulement, de manière à avoir des sérums de titres différents. Dans tous les cas, la conservation de ces sérums nous est apparue excellente. Une grande partie de notre travail (essais de conservation, comparaison des méthodes, etc...) a été effectuée en prenant pour référence, soit des sérums lyophilisés de singe soit un sérum de référence du commerce.

Nous nous sommes cependant rendu compte à l'usage, que le sérum de singe présentait comme sérum de contrôle quelques inconvénients :

— titre un peu bas ;

— difficultés dans l'appréciation du virage par la méthode amyloclastique avec le sérum provenant de certains singes (cette difficulté pourrait être éliminée en faisant un triage préalable) ;

— chiffre inexplicablement beaucoup trop bas par la méthode de DORCHE et Coll. (Nous reviendrons sur ce problème plus tard.) C'est pourquoi, vers la fin de ce travail, nous avons décidé de préparer un autre sérum de référence constitué par un sérum humain enrichi en amylase par de la salive.

Mode de préparation d'un sérum de référence constitué par un mélange salive-sérum humain.

Un mélange de sérums humains titrés par la méthode amyloclastique nous donne un titre de 90 Unités.

Des titrages préliminaires effectués par la méthode amyloclastique nous montrent qu'il faut ajouter à 2 parties de sérum une partie de salive diluée au 1/25 pour obtenir un titre voisin de 300 Unités.

Un mélange réalisé dans ces conditions est lyophilisé. Après lyophilisation, les résultats obtenus sont les suivants :

- Méthode amyloclastique : 300 Unités.
- Méthode saccharogénique de SOMOGYI : 334 Unités.
- Méthode saccharogénique de DORCHE et Coll. : 265 Unités.
- Méthode Iodométrique de SMITH et ROE : 315 Unités.

Les résultats obtenus avec ce mélange apparaissent valables. La méthode de DORCHE et Coll. donne un taux plus faible, mais dans des proportions normales, la température de 37° à laquelle est effectuée cette réaction expliquant ce décalage. C'est finalement cette formule qui nous paraît la meilleure pour préparer un sérum de référence.

V. — COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS PAR LES METHODES ETUDIEES

Les conditions opératoires étant fixées, nous avons effectué des dosages par les quatre méthodes étudiées, sur des sérums d'origine diverse. Dans certains cas, la quantité de sérum étant trop faible, nous n'avons pas pu pratiquer les dosages par toutes les méthodes. Les résultats trouvés figurent dans les tableaux suivants.

TABLEAU IX
DOSAGES EFFECTUES SUR DES SERUMS DE REFERENCE

Echantillon titré	Méth. sacch. SOMOGYI	Méth. sacch. DORCHE	Méth. amylo- clastique	Méth. iodo- métrique
Sérum de réf- érence du com- merce.	205	186	220	196
Sérum de singe lyophilisé	145	77	138	135
Sérum humain enrichi en amylase.	334	265	300	315

TABLEAU X

DOSAGES EFFECTUES SUR DES SERUMS HUMAINS
PROVENANT DE SUJETS SUPPOSES NORMAUX

Echantillon titré	Méth. sacch. SOMOGYI	Méth. sacch. DORCHE	Méth. amylo- clastique	Méth. iodo- métrique
Sérum 1	95	85	106	—
Sérum 2	76	61	73	79
Sérum 3	95	68	100	—
Sérum 4	89	60	95	—
Sérum 5	56	54	45	—
Sérum 6	85	70	86	88
Sérum 7	73	65	76	—
Sérum 8	73	65	69	—
Sérum 9	81	69	63	—
Sérum 10	230	165	220	—
Sérum 11	75	77	76	90
Sérum 12	58	61	60	—
Sérum 13	44	51	45	—
Sérum 14	122	103	120	—
Sérum 15	51	53	49	—
Sérum 16	69	76	73	69
Sérum 17	73	73	73	—
Sérum 18	51	60	56	—
Sérum 19	44	52	53	—
Sérum 20	62	74	80	—
Sérum 21	45	58	46	—
Sérum 22	69	88	69	—
Sérum 23	82	81	70	—
Sérum 24	79	91	82	—
Sérum 25	126	94	90	107
Sérum 26	89	68	76	76
Sérum 30	84	81	73	—
Moyenne	80	74	79	

TABLEAU XI

DOSAGES EFFECTUES SUR DES SERUMS PATHOLOGIQUES
(une partie de ces dosages a été effectuée à l'Hôpital de la Croix-Rousse)

Echantillon titré	Méth. sacch. SOMOGYI	Méth. sacch. DORCHE	Méth. amylo- clastique	Méth. iodo- métrique
Sérum 1	274	—	258	277
Sérum 2	350	—	405	366
Sérum BORT	—	228	257	—
Sérum LEB	—	253	250	—
Sérum MOL ₁	—	257	276	—
Sérum MOL ₂	—	492	360	—
Sérum MOL ₃	—	352	300	—
Sérum MOL ₄	—	408	400	—
Sérum MOL ₅	—	350	514	—
Sérum MOL ₆	—	424	450	—
Sérum MOL ₇	—	378	400	—

De ces trois tableaux ,nous pouvons tirer les couclusions suivantes :

1° Lorsque les dosages sont effectués sur des sérums de référence, les chiffres obtenus par les quatre méthodes sont assez semblables, compte tenu de l'écart systématique de 10 % pour la méthode de DORCHE et Coll. Dans le cas du sérum de singe, les résultats donnés par cette méthode accusent des différences plus importantes. Ce fait sera confirmé et explicité.

2° Lorsque les dosages sont effectués sur des sérums provenant de sujets normaux, nous avons trouvé des chiffres qui, 26 fois sur 27 dosages pratiqués étaient situés dans les normes indiquées par les auteurs. Il ne nous a pas été possible de vérifier si le taux anormalement élevé trouvé chez un donneur pouvait être expliqué. Les résultats fournis par la méthode de DORCHE et Coll. sont encore, dans ce cas, 10 % plus faibles.

3° Dans le cas des sérums pathologiques, les divergences notées sont dans certains cas nettement plus importantes. Malheureusement, il n'a pas toujours été possible de vérifier les résultats obtenus,

l'insuffisance des prélèvements ne permettant pas toujours de recommencer les dosages dans des conditions mieux appropriées (choix de la dilution optimum). Dans l'ensemble, cependant, les résultats se recoupent suffisamment et la méthode amyloclastique supporte assez bien la comparaison avec les autres méthodes.

ETUDE DUN LIQUIDE D'ASCITE TRES RICHE EN AMYLASE

Nous avons pu nous procurer, à l'hôpital de la Croix-Rousse, un liquide d'ascite provenant d'un malade atteint d'une fistule du pancréas. Ce liquide très riche en amylase, nous a paru mériter une étude particulière. Nous avons pratiqué simultanément des dosages d'amylase par trois méthodes différentes sur le liquide d'ascite, le sérum et l'urine prélevés chez ce malade. Les résultats trouvés ont été les suivants :

	Liquide d'ascite	Sérum	Urines
Méth. Sacch. SOMOGYI	220.000 Unités	—	1.540 Unités
Méth. Sacch. DORCHE	34.000 Unités	845 Unités	235 Unités
Méth. amyloclastique	120.000 Unités	525 Unités	1.500 Unités

Le taux de protéines du liquide d'ascite était de 5 g/litre.

Deux points importants sont à noter :

1° Le taux d'amylase extrêmement élevé dans le liquide d'ascite. Ce taux permet de penser que du suc pancréatique s'était répandu dans le péritoine.

2° Les chiffres nettement plus bas fournis par la méthode de DORCHE et Coll. lors du dosage de l'amylase dans le liquide d'ascite et dans l'urine. Cette technique qui semble bien convenir pour le dosage de l'amylase sérique humaine, paraît beaucoup moins bien adaptée au dosage de cet enzyme dans d'autres liquides biologiques, notamment lorsque les quantités d'amylase à doser sont élevées.

Le liquide d'ascite étant très riche en amylase, nous avons tenté de préciser la localisation de l'enzyme sur les protéines en pratiquant une électrophorèse. Nous avons procédé de la manière suivante :

a) Le liquide d'ascite dont la concentration protéique était de 5 grammes par litre, a été concentré 10 fois par dialyse contre du Carbovax.

b) Deux bandes d'électrophorèse ont été faites en même temps (prise d'essai 40 mm³ ; durée de l'électrophorèse : 15 h. 30, contre un tampon véronal pH 8,6, appareillage Elphor).

c) Une bande a été colorée par l'amido-Schwartz. Elle permet de mettre en évidence 6 fractions qui se répartissent de la manière suivante :

Alb	:	4	%.
α_1 Glob	:	3,5	%.
α_2 Glob	:	5	%.
β Glob	:	30	%.
γ Glob	:	15	%.
Fraction X	:	42	%.

Dans cette électrophorèse, on peut reconnaître les fractions sériques habituelles auxquelles serait venue se rajouter une fraction importante non identifiée provenant vraisemblablement du suc pancréatique.

d) La deuxième bande a été découpée en 11 parties égales, la première étant située au point de départ des protéines. Chacune de ces parties, de 1 cm de large, a été mise à tremper pendant une nuit à + 4° dans des tubes renfermant 1 ml de sérum physiologique.

Des dosages d'amylase ont été effectués par la méthode saccharogénique de SOMOGYI sur chaque partie.

Les résultats obtenus sont les suivants :

N° Des TUBES	TAUX D'AMYLASE
1	1,17 U
2	1,33 U
3	3,6 U
4	13,5 U
5	3,6 U
6	0,17 U
7	0 U

Tous les autres tubes ne renfermaient pas d'amylase. La plus grande activité est retrouvée sur la bande N° 4 qui correspond au point de migration de la protéine non identifiée mentionnée plus haut. Les autres fractions sériques renferment très peu d'amylase.

Ces essais, paraissent démontrer que le liquide étudié, était constitué par un mélange de liquide d'ascite et de suc pancréatique. En font foi :

- le taux d'amylase très élevé ;
- la présence d'une fraction protéique supplémentaire à l'électrophorèse.
- la localisation de l'activité amylasique sur cette protéine.

VI. — ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE ET DE LA PRECISION DES METHODES EMPLOYEES

Afin de vérifier la reproductibilité des méthodes de dosage étudiées, nous avons pratiqué à des jours différents de nombreux dosages par toutes ces méthodes sur un même pool de sérums de singe lyophilisé. L'écart type calculé dans chaque cas permet d'avoir une représentation chiffrée de la reproductibilité.

Le substrat a été le même pour chaque type de dosage.

Les résultats sont rassemblés ci-après.

METHODE SACCHAROGENIQUE DE SOMOGYI

Dates des dosages	Dosages effectués	Résultats	Ecart avec la moyenne	Carré des écarts
8-11-1963	N° 1	144	5	25
	N° 2	144	5	25
	N° 3	148	1	1
12-11-1963	N° 4	162	13	169
	N° 5	162	13	169
	N° 6	164	15	225
	N° 7	157	8	64
	N° 8	152	3	9
	N° 9	157	8	64
	N° 10	142	7	49
13-11-1963	N° 11	138	11	121
	N° 12	138	11	121
14-11-1963	N° 13	140	9	81
	N° 14	140	9	81
	N° 15	144	5	25
15-11-1963	N° 16	134	15	225
	N° 17	142	7	49
	N° 18	142	7	49
21-11-1963	N° 19	159	10	100
	N° 20	159	10	100
	N° 21	155	6	36
		3123		1788

$$\text{Moyenne} = \frac{3125}{21} = 149$$

$$\text{Ecart type} = \sqrt{\frac{1788}{21-1}} = 9,4$$

METHODE AMYLOCLASTIQUE

Dates des dosages	Dosages effectués	Résultats	Ecart avec la moyenne	Carré des écarts
18-11-1963	N° 1	138	1	100
	N° 2	138	10	100
21-11-1963	N° 3	138	10	100
25-11-1963	N° 4	129	10	1
	N° 5	129	1	1
	N° 6	129	1	1
	N° 7	129	1	1
	N° 8	129	1	1
	N° 9	120	8	64
	N° 10	129	1	1
	N° 11	129	1	1
27-11-1963	N° 12	150	22	484
	N° 13	120	8	64
	N° 14	120	8	64
	N° 15	120	8	64
	N° 16	120	8	64
	N° 17	129	1	1
	N° 18	129	1	1
	N° 19	120	8	64
	N° 20	129	1	1
	N° 21	120	8	64
		2694		1242

$$\text{Moyenne} = \frac{2694}{21} = 128$$

$$\text{Ecart type} = \sqrt{\frac{1242}{21-1}} = 7,9$$

METHODE SACCHAROGENIQUE D'OST-DORCHE

Dates des dosages	Dosages effectués	Résultats	Ecart avec la moyenne	Carré des écarts
20-11-1963	N° 1	75	9	81
	N° 2	75	13	169
21-11-1963	N° 3	83	17	289
	N° 4	83	17	289
	N° 5	87	21	441
26-11-1963	N° 6	65	1	1
	N° 7	65	1	1
	N° 8	61	5	25
	N° 9	62	4	16
	N° 10	62	4	16
	N° 11	59	7	49
	N° 12	59	7	49
	N° 13	63	3	9
	N° 14	59	7	49
	N° 15	59	7	49
27-11-1963	N° 16	63	3	9
	N° 17	59	7	49
	N° 18	61	5	25
	N° 19	61	5	25
	N° 20	57	9	81
		1322		1722

$$\text{Moyenne} = \frac{1322}{20} = 66$$

$$\text{Ecart type} = \sqrt{\frac{1723}{20-1}} = 9,5$$

METHODE IODOMETRIQUE DE SMITH ET ROE MODIFIEE

Dates des dosages	Dosages effectués	Résultats	Ecart avec la moyenne	Carré des écarts
18-11-1963	N° 1	124	11	121
	N° 2	139	4	16
	N° 3	132	3	9
	N° 4	157	22	484
	N° 5	149	14	196
	N° 6	149	14	196
19-11-1963	N° 7	122	13	169
	N° 8	122	13	169
	N° 9	129	6	36
	N° 10	140	5	25
	N° 11	140	5	25
	N° 12	147	12	144
20-11-1963	N° 13	129	6	36
	N° 14	129	6	36
	N° 15	148	13	169
	N° 16	129	6	36
	N° 17	129	6	36
	N° 18	136	1	1
	N° 19	127	8	64
	N° 20	120	15	225
	N° 21	136	1	1
		2833		2194

$$\text{Moyenne} = \frac{2833}{21} = 135$$

$$\text{Ecart type} = \sqrt{\frac{2194}{21-1}} = 10,5$$

RESUME DES RESULTATS OBTENUS

	Moyenne	Ecart type
Méthode saccharogénique de SOMOGYI	149	9,4
Méthode amyloclastique	128	7,9
Méthode saccharogénique OST-DORCHE	66	9,5
Méthode iodométrique SMITH et ROE	135	10,5

Conclusions.

La meilleure reproductibilité est obtenue avec la méthode amyloclastique. Ceci est peu surprenant car, dans ce cas, la technique est simple et le substrat bien défini.

Les méthodes saccharogéniques et iodométriques de SOMOGYI fournissent des résultats assez voisins. Par contre, avec la méthode de DORCHE et Coll., les résultats obtenus sont régulièrement et sensiblement plus bas. Nous avons déjà fait cette constatation avec le sérum de singe. Pour l'expliquer, on peut supposer que l'amylase du sérum de singe donne, à partir de l'amidon, une plus grande proportion de polysaccharides que ne le fait l'amylase humaine. Ces polysaccharides seraient incomplètement dosés par la méthode d'OST-DORCHE qui est davantage adaptée au dosage du glucose. Les auteurs de cette technique avaient d'ailleurs déjà constaté que la réduction du cuivre était proportionnellement meilleure avec le glucose qu'avec un simple dissaccharide comme le maltose.

Il faut également remarquer que l'on note une différence dans les résultats trouvés entre la méthode saccharogénique de SOMOGYI (149 U.S.) et la méthode amyloclastique (128 U.S.), différence qui n'était pas apparue lors des comparaisons que nous avons effectuées sur du sérum humain.

VII. — ETUDE DE L'INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR LE DOSAGE DE L'AMYLASE SÉRIQUE

Bien qu'ayant trouvé dans la littérature de nombreux renseignements concernant l'influence de différents facteurs sur le dosage de l'amylase sérique, nous avons tenté, au cours de ce travail, de préciser le rôle de certains d'entre eux. Pour ceci, nous avons utilisé dans la plupart des cas une seule des techniques de dosage.

A. — INFLUENCE DES ANTICOAGULANTS

Cette étude a été pratiquée de la manière suivante :

1° Adjonction d'anticoagulants à des sérums et dosage immédiat de manière à vérifier leur action éventuelle sur la réaction enzymatique.

2° Récolte du sang sur des anticoagulants et dosage après un temps de contact de plusieurs heures afin de vérifier leur action sur l'amylase elle-même.

3° Les doses d'anticoagulants choisies sont celles que l'on utilise en pratique courante. Etant donné l'importance des prélèvements à effectuer, les dosages ont été réalisés sur du sang de mouton. La méthode de dosage employée était la méthode saccharogénique de SOMOGYI.

Il a été également vérifié sur du sang humain que les dosages pouvaient être effectués aussi bien sur du sérum que sur du plasma.

— Résultats obtenus après adjonction d'anticoagulant à du sérum.

60 ml de sérum provenant d'un même mouton ont été répartis de la manière suivante :

- (1) Sérum sans anticoagulant ;
- (2) 10 ml de sérum + 2 gouttes d'héparine ;
- (3) 9 ml de sérum + 1 ml de mélange de Wintrobe ;
- (4) 10 ml de sérum + 100 mg de fluorure de sodium ;
- (5) 9 ml de sérum + 1 ml de solution d'EDTA à 1 % ;
- (6) 9 ml de sérum + 1 ml de solution de citrate trisodique à 4 %.

On a tenu compte de la dilution du prélèvement lorsque l'anticoagulant était ajouté sous forme de solution.

Résultats :

Sérum	147 U
Sérum + Héparine	156 U
Sérum + Wintrobe	154 U
Sérum + Fluorure	152 U
Sérum + EDTA	153 U
Sérum + Citrate	164 U

Dans tous les cas, les taux de glucose trouvé sur les témoins étaient identiques.

Aucun des anticoagulants étudiés n'intervient dans la réaction enzymatique.

— **Résultats obtenus après prélèvement du sang sur anticoagulants.**

10 ml ou 9 ml de sang provenant d'un seul mouton sont recueillis sur les quantités d'anticoagulants mentionnées dans l'essai précédent.

Les dosages sont effectués 5 heures après le prélèvement.

Sang	130 U
Sang + Héparine	132 U
Sang + Wintrobe	130 U
Sang + Fluorure	127 U
Sang + EDTA	—
Sang + Citrate	—

Les dosages n'ont pu être pratiqués sur les prélèvements renfermant du citrate et de l'EDTA, car le plasma était très fortement hémolysé, et ceci malgré plusieurs essais.

Le taux de glucose trouvé sur chaque prélèvement était sensiblement identique.

Conclusions :

Les anticoagulants étudiés n'agissent pas sur l'amylase.

— Résultats obtenus sur du sérum et du plasma humains par trois techniques de dosage :

TABEAU XII

Méthodes	Plasma	Sérum
Méthode saccharogénique de SOMOGYI	89	95
Méthode saccharogénique de DORCHE	84	85
Méthode amyloclastique	100	108

Pour le plasma, le sang a été recueilli sur 0,4 ml de solution de citrate à 10 %.

Les dosages effectués par trois techniques différentes sur du sérum ou du plasma donnent des résultats identiques.

Conclusions.

Les anticoagulants utilisés couramment en biologie clinique apparaissent sans influence sur le dosage de l'amylase, dans des conditions de travail normales (5 heures de contact), ce qui est conforme aux résultats décrits dans les travaux antérieurs. Le dosage de l'amylase par la méthode saccharogénique de SOMOGYI est possible aussi bien sur le sérum que sur le plasma. Des dosages effectués en présence de citrate paraissent montrer qu'il en est de même avec les autres techniques.

B. — INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION

La température d'incubation utilisée étant, pour une même technique, tantôt de 37°, tantôt de 40°, nous avons voulu vérifier l'influence de cette modification. Les dosages ont été réalisés par les méthodes saccharogénique et amyloclastique de SOMOGYI. Les résultats trouvés (moyenne d'une vingtaine de dosages) ont été les suivants :

TABLEAU XIII

Méthodes	40°	37°	Différence %
Méthode saccharogénique de SOMOGYI	149	138	# 7 %
Méthode amyloclastique	144	128	# 11 %

Les différences retrouvées sont de l'ordre de celles signalées par la plupart des auteurs, soit environ 10 %.

C. — INFLUENCE DU TAUX DE GLUCOSE DU SÉRUM A TITRER

— Méthode saccharogénique.

Nous avons choisi un sérum humain dont le titre en amylase était d'environ 400 unités SOMOGYI (sérum normal enrichi par la salive). Nous avons titré l'amylase sur le sérum seul et sur le même sérum additionné de glucose à raison de 1 g et de 6 g par litre. Nous avons titré ces échantillons par la méthode saccharogénique de SOMOGYI.

Pour que les conditions du dosage restent valables, aussi bien du point de vue du dosage du glucose que de celui de l'amylase, nous avons été obligés de diluer au 1/2 l'échantillon additionné de 1 g de glucose et au 1/4 celui additionné de 6 g de glucose. Dans ces conditions, les résultats obtenus ont été les suivants :

	Témoin glucose	Amylase
Sérum sans glucose	51 mg %	407 U
Sérum additionné de 1 g de glucose par litre	160 mg %	388 U
Sérum additionné de 6 g de glucose par litre	605 mg %	406 U

Dans ces conditions opératoires, nous n'avons pu mettre en évidence, contrairement à ce qui est généralement signalé dans la littérature, une inhibition de l'amylase sérique par le glucose.

— Méthode amyloclastique.

Un sérum normal est enrichi de la même manière en amylase par de la salive. On ajoute des quantités croissantes de glucose (de 1 à 10 g par litre). Les dosages sont effectués sur 0,5 ml de sérum.

Quantités de glucose ajoutées	Amylase
0	466 U
1 g/Litre	466 U
2 g/Litre	450 U
4 g/Litre	450 U
6 g/Litre	466 U
10 g/Litre	437 U

Avec cette méthode, l'adjonction de glucose même à des taux très élevés ne modifie pas les résultats trouvés. Pour 10 g/litre, on note une légère diminution qui n'est cependant pas vraiment significative.

D. — ETUDE DE LA CONSERVATION DES SERUMS

Nous avons vu précédemment qu'un sérum lyophilisé conservait son activité amylasique intacte pendant une période très longue. Nous avons également essayé de suivre la conservation d'un sérum telle qu'elle est couramment réalisée dans les laboratoires.

Pour cette étude, nous avons utilisé la méthode amyloclastique, qui présente les avantages d'un substrat bien standardisé et d'une prise d'essai relativement faible. Le sérum humain normal que nous avons à notre disposition a été réparti en tubes à hémolyse, de manière à éviter les prélèvements successifs, et par suite, les contaminations microbiennes.

Des séries de tubes ont été placées à -20° , à $+4^{\circ}$, et à la température du laboratoire. Pour les échantillons conservés à $+4^{\circ}$ et

à la température du laboratoire, les dosages ont été presque journaliers ; pour ceux conservés à -20° , ils ont eu lieu de semaine en semaine. Les résultats des dosages ont été notés dans le tableau suivant.

TABLEAU XIV

Jour du dosage	-20°	$+4^{\circ}$	Température du laboratoire
11-7-1963	86	86	86
12-7-1963	—	82	86
15-7-1963	82	82	82
16-7-1963	—	90	86
17-7-1963	—	86	86
18-7-1963	—	82	90
19-7-1963	—	86	90
22-7-1963	—	86	106
23-7-1963	90	86	150
29-7-1963	90	—	—

Les sérums conservés à -20° et à $+4^{\circ}$ ne présentent pas, pendant la période d'essai, de modification de titre très significative. Ceci prouve que l'amylase est une enzyme relativement stable. Cependant, à partir du onzième jour, de conservation, le titre du sérum maintenu à la température du laboratoire s'élève notablement. Cette élévation est sans doute liée à une contamination microbienne. On notait en effet à partir du 22-7 un trouble assez important dans les tubes de sérum conservés à cette température, ceci malgré les précautions d'asepsie qui avaient été prises au cours des prélèvements, et des manipulations.

Du point de vue pratique, il apparaît que l'on peut conserver les sérums à $+4^{\circ}$ pendant plusieurs jours, sans que cela se manifeste par une diminution sensible du titre. Les dosages ne doivent pas être effectués sur un sérum contaminé.

E. — INFLUENCE DE LA DUREE DE L'EBULLITION
LORS DU DOSAGE DES SUCRES PAR LES METHODES
SACCHAROGENIQUES (TEMPS DE REDUCTION)

Nous avons noté à plusieurs reprises que les titres obtenus étaient nettement plus bas lorsque les dosages étaient effectués sur des sérums de singe par la méthode de DORCHE et Coll. Nous avons supposé que cette différence pouvait être attribuée au fait que l'amylase de singe donnerait plus de polysaccharides à partir de l'amidon que ne le ferait un sérum humain, et que ces polysaccharides étaient incomplètement dosés par cette méthode. Nous avons pensé qu'en prolongeant les temps d'ébullition normaux au cours du dosage des sucres, nous pourrions déterminer quelle proportion de sucre échappait au dosage, dans les conditions opératoires normales.

La vérification a été faite sur un sérum de singe et sur un sérum humain par les méthodes saccharogéniques de SOMOGYI et de DORCHE. Les temps d'ébullition ont été prolongés de 8 à 16 minutes pour la méthode de SOMOGYI (FOLIN et WU) et de 10 à 20 minutes pour la méthode de DORCHE (OST-DORCHE). Les résultats sont résumés ci-après.

METHODE SACCHAROGENIQUE DE DORCHE

	Sérum de singe		Sérum humain	
	Amylase	Pouvoir réducteur exprimé en glucose	Amylase	Pouvoir réducteur exprimé en glucose
Ebullition 10 minutes	98 U	80 mg %	70 U	89 mg %
Ebullition 20 minutes	117 U	88 mg %	79 U	97 mg %
Pourcentage d'augmentation du pouvoir réducteur	19 %	10 %	12,8 %	9 %

METHODE SACCHAROGENIQUE DE SOMOGYI

	Sérum de singe		Sérum humain	
	Amylase	Pouvoir réducteur exprimé en glucose	Amylase	Pouvoir réducteur exprimé en glucose
Ebullition 8 minutes	162 U	83 mg %	73 U	92 mg %
Ebullition 16 minutes	167 U	86 mg %	77 U	96 mg %
Pourcentage d'augmentation du pouvoir réducteur	3 %	3,6 %	5,5 %	4,3 %

A partir de ces résultats, on peut faire les constatations suivantes :

1° On retrouve les différences déjà signalées entre les résultats trouvés sur le sérum de singe par les méthodes de SOMOGYI et de DORCHE.

Par contre, sur le sérum humain les résultats sont très proches.

2° Dans tous les cas, on obtient en doublant les temps d'ébullition une augmentation du pouvoir réducteur. Cette augmentation est cependant plus forte avec la méthode de DORCHE, qu'avec celle de SOMOGYI.

3° Avec la méthode de SOMOGYI, le pourcentage d'augmentation du pouvoir réducteur dosé est pratiquement le même avant ou après action de l'amylase, qu'il s'agisse de sérum humain ou de sérum de singe.

Par contre, si l'on retrouve à peu près ce parallélisme avec la méthode de DORCHE lorsqu'il s'agit de sérum humain, on note une différence assez importante lorsqu'il s'agit du sérum de singe (9 %). Ceci correspond sans doute à la présence de polysaccharides libérés par l'amylase et très incomplètement dosés dans les conditions normales de l'analyse.

VIII. — ESSAIS DE DOSAGE DE L'AMYLASE URINAIRE PAR LA METHODE AMYLOCLASTIQUE

Comme dans le cas du dosage de l'amylase sérique, nous avons choisi, a priori, la méthode saccharogénique de SOMOGYI comme méthode de référence. En dehors des avantages précédemment cités, cette méthode présente l'intérêt par rapport à celle de DORCHE et Coll., par exemple, d'utiliser un substrat tamponné, ce qui est très important dans le cas de l'urine.

Avant de passer à l'application de la méthode amyloclastique au dosage de l'amylase urinaire, ce qui, de prime abord, nous est apparu assez délicat, nous avons essayé de déterminer dans quelle mesure il était possible de conserver les urines avant d'effectuer les dosages.

A. — ETUDE DE LA CONSERVATION DE L'AMYLASE DANS LES URINES

L'urine de par sa composition est un milieu peu favorable à la conservation des enzymes. C'est aussi un milieu qui est très fréquemment souillé de germes. Nous avons voulu déterminer :

- ce que devenait l'amylase dans ce milieu ;
- si certains conservateurs étaient susceptibles d'enrayer un développement bactérien, sans pour autant modifier l'activité de l'amylase.

Les essais ont été pratiqués de la manière suivante :

Les échantillons d'urine ont été placés dans des flacons de 60 ml, non bouchés, et conservés pendant 6 jours à la température du laboratoire. Ces échantillons se répartissaient de la manière suivante :

- urine seule ;
- urine renfermant 1 g de Fluorure de sodium par litre ;
- urine renfermant 3 g de parahydroxybenzoate de Méthyle (Nipagine) par litre ;
- urine renfermant 1 g de parahydroxybenzoate de Propyle (Nipasol) par litre ;
- urine renfermant 1 g d'azide de sodium par litre.

Les quantités d'antiseptique ajoutées ont été choisies en fonction des conditions habituelles d'utilisation. Certains d'entre eux (Nipagine, Nipasol) se dissolvent mal. Une partie reste au fond du flacon.

Les dosages ont été effectués 24 heures, 48 heures et 6 jours après le prélèvement. Les résultats sont notés dans le tableau suivant. Un examen microscopique a été effectué le 6^e jour.

TABLEAU XV

Echantillon	Jour du prélèvement		Conservation 24 heures		Conservation 48 heures		Conservation 6 jours	
	Titre	Aspect	Titre	Aspect	Titre	Aspect	Titre	Aspect
Urine seule	137	Clair	119	Léger trouble	111	Trouble important	152	Urine très trouble Très nombreux germes ; à l'examen direct quelques cristaux d'oxalate.
Urine + FNa	138	Clair	118	Précipité abondant	100	Précipité abondant	103	Urine très trouble. Assez nombreux germes, sédiment amorphe.
Urine + Nipagine	130	Clair	108	Urine claire	105	Urine claire	105	Germes rares, pas de sédiment.
Urine + Nipazol	135	Clair	110	Urine claire	100	Urine claire	98	Germes rares, pas de sédiment.
Urine + Azide de Sodium	130	Clair	116	Urine claire	101	Urine Claire	105	Germes rares, pas de sédiment.

On peut faire les commentaires suivants :

1° L'activité amylasique se conserve relativement mal dans les urines. On la voit diminuer dans tous les échantillons après le premier jour de conservation. On note une augmentation importante au sixième jour de conservation dans l'urine n'ayant pas reçu d'antiseptique. Cette augmentation semble en relation avec la pollution microbienne.

2° Les antiseptiques essayés ne paraissent pas avoir d'action toxique sur l'amylase.

3° Le fluorure de sodium s'est révélé un assez mauvais antiseptique. L'urine qui le contenait était assez fortement contaminé au sixième jour de conservation. Il est cependant possible qu'il ait empêché sélectivement la pousse de certains germes, car on n'as pas noté dans cet échantillon une augmentation de l'activité amylasique.

4° Les autres antiseptiques ont donné de bons résultats. On pourra donc les utiliser pour recueillir les urines. Ceci ne permettra cependant pas d'éviter une baisse d'activité de l'amylase au cours de la conservation.

B. — DOSAGE DE L'AMYLASE URINAIRE PAR PLUSIEURS METHODES

Un premier essai a été pratiqué sur quatre échantillons d'urine par les méthodes saccharogéniques de SOMOGYI et de DORCHE et par la méthode amyloclastique afin de vérifier rapidement si les résultats obtenus étaient comparables. Il faut noter qu'avec les techniques de SOMOGYI, on utilise un substrat tamponné, alors qu'avec la méthode de DORCHE, on neutralise l'urine par adjonction de bicarbonate de potassium (DORCHE, LUX [23]).

Les résultats sont les suivants :

Urines	Méthode sacchar. de SOMOGYI	Méthode sacchar. de DORCHE	Méthode amyloclastique
1	170 U	189 U	≠ 138 U
2	188 U	206 U	≠ 150 U
3	230 U	183 U	Lecture impossible
4	540 U	555 U	Lecture impossible

Des dosages effectués par la méthode iodométrique de SMITH et ROE (modifiée par P.V. FERRO) nous ont donné des résultats très différents, en moyenne deux fois plus élevés, si bien que nous avons décidé de ne pas employer cette technique pour le dosage de l'amylase urinaire.

On remarque que les résultats obtenus par les méthodes saccharogéniques sont assez comparables. Par contre, lorsque le dosage est effectué par la méthode amyloclastique, on se rend compte tout de suite que le virage est beaucoup plus difficile à apprécier que dans le sérum. Deux cas peuvent se présenter :

1° Le virage s'effectue par paliers très rapprochés, et il est très difficile de saisir la coloration brune qui correspond au terme de la réaction.

2° L'adjonction du mélange substrat-urine se manifeste par l'apparition d'une coloration très fugace, le mélange se décolorant aussitôt.

Ces constatations nous ont conduit à chercher une modification de la technique amyloclastique permettant d'appliquer ce dosage à l'urine.

C. — ESSAIS D'ADAPTATION DE LA METHODE AMYLOCLASTIQUE AU DOSAGE DE L'AMYLASE URINAIRE

SOMOGYI indique que la méthode amyloclastique peut être employée indifféremment pour le dosage de l'amylase sérique urinaire, ou salivaire. Nous avons vu d'autre part que d'après cet auteur, la netteté du virage était influencée par le rapport Iode/protéines. Ces contradictions pouvaient nous faire penser que nous aurions quelques difficultés à adapter la technique amyloclastique au dosage de l'amylase urinaire. En effet, dès les premiers dosages que nous avons effectués, nous nous sommes rendus compte que le virage très facile à saisir sur le sérum, se lisait très mal dans le cas de l'urine. Pour essayer d'éviter cet écueil, nous avons tenté d'apporter quelques modifications à la technique : addition d'albumine ou de sérum, dialyse de l'urine, modification de la concentration de la solution d'iode.

1° Essai d'addition d'albumine à l'urine :

Nous avons pensé améliorer le dosage en ajoutant à l'urine une quantité d'albumine humaine ou bovine équivalente à celle que l'on trouve normalement dans un sérum. Pour ceci, nous avons vérifié au préalable :

- que les albumines employées ne renfermaient pas d'amylase ;
- que l'addition d'albumine à l'urine n'inhibait pas ou ne potentialisait pas l'action de l'amylase. Des dosages effectués dans ce but par la méthode saccharogénique de SOMOGYI nous ont donné les résultats suivants :

Urine seule	174 U
Urine + Albumine bovine 60 g %	163 U

Ces résultats permettent d'affirmer que l'albumine n'intervient pas dans le dosage.

Par contre, au cours d'une première série d'essais effectués avec la méthode amyloclastique, nous avons obtenu sur une autre urine les taux d'amylase suivants :

	Taux d'Amylase
— Sérum physiologique + albumine humaine 60 g/litre	0
— Sérum physiologique + albumine bovine 60 g/litre	0
— Urine seule	525 U (virage net)
— Urine + albumine humaine 60 g/litre ..	871 U (virage très net)
— Urine + albumine bovine 60 g/litre	814 U (virage très net)

On remarque que l'addition d'albumine de quelque origine qu'elle soit :

- renforce la netteté du virage ;
- conduit à l'obtention de résultats nettement plus élevés.

Nous avons confirmé ces faits en pratiquant des dosages par les méthodes saccharogénique et amyloclastique sur des urines additionnées ou non d'albumine. Les résultats sont mentionnés dans le tableau ci-après.

TABLEAU XVI

Urine	Méthode saccharogénique		Méthode amyloclastique	
	Urine seule	Urine + Albumine humaine 60 g/litre	Urine seule	Urine + Albumine humaine 60 g/litre
N° 1	202	170	≠ 225 virage peu net	412 U virage très net
N° 2	159	151	164 virage net	281 virage très net

Tout se passe comme si l'albumine ajoutée renforçait l'activité de l'amylase lorsque celle-ci est déterminée par la méthode amyloclastique. Les dosages effectués par la méthode saccharogénique nous montrent qu'il n'en est rien.

Devant cette constatation, nous avons essayé d'ajouter des concentrations croissantes d'albumine afin de vérifier s'il était possible de conserver un virage net sans, pour autant, obtenir des chiffres trop élevés.

	Urine seule	Urine + Alb. 15 g/litre	Urine + Alb. 50 g/litre	Urine + Alb. 60 g/litre
Amylase	≠ 40 U virage impossible à lire	≠ 40 U virage très difficile à lire	≠ 55 U virage peu net	≠ 64 U virage net

La concentration de 60 g/litre s'avère donc être la concentration optimum, mais à ce taux, les résultats sont trop élevés.

Nous avons voulu également vérifier si cette augmentation notée par la méthode amyloclastique était provoquée uniquement par l'albumine ou par d'autres fractions sériques. Pour ceci, nous avons effectué les essais mentionnés dans le tableau suivant, sur une urine dont le titre en amylase déterminé par la méthode saccharogénique était de 109 unités.

TABLEAU XVII

	Urine seule	Urine + Alb. 60 g/litre	Urine + Glob. 60 g/litre	Urine + 60 g/l d'un mélange alb. 2 p. + glob. 1 p.
Amylase	# 113 U virage peu net	205 U virage très net	# 164 U virage peu net	209 U virage très net

L'addition de globuline amène une augmentation plus faible du titre que l'addition d'albumine, mais le virage reste incertain. Le mélange albumine-globuline se comporte sensiblement comme l'albumine seule.

Nous n'avions pu donner d'explications à ces constatations quelque peu surprenantes. Cependant, récemment (octobre 1964) un auteur américain N.-R. PIMSTONE [65] a observé le même phénomène et a décrit deux facteurs sériques susceptibles d'avoir une activité de « pseudo-amylase », l'un, en faisant disparaître rapidement la coloration donnée par l'iode, et l'amidon, l'autre, à action plus lente, atténuant cette coloration progressivement et agissant seulement en milieu acide. Cet auteur explique ce fait par un phénomène physique, l'amidon étant adsorbé à la surface des molécules protéiques. REIFF et NABSETH [68] ont constaté que l'hémoglobine avait le même effet.

Il est toutefois curieux de noter que :

- dans l'urine, en l'absence de protéines, l'appréciation du virage se fait très mal.
- l'addition de protéines, albumines ou globulines ajoutées à l'urine facilitent la lecture de la réaction, mais se comportent comme des pseudo-amylases.

— Sur le sérum humain, riche en albumine, la lecture est facile et nous n'avons pas noté d'effet « pseudo-amylasique » en comparant les résultats obtenus avec la méthode amyloclastique à ceux de la méthode saccharogénique.

— Sur un grand nombre de sérums animaux, le titre en amylase déterminé par la méthode saccharogénique est élevé. Avec la méthode amyloclastique, tout se passe comme s'il y avait des substances « anti-amylases ».

Tous ces faits contradictoires et qui mériteraient d'être étudiés de manière plus approfondie, montrent la complexité de la réaction classique iode + amidon et, par suite, celle de toutes les méthodes iodométriques du dosage de l'amylase.

2° Etude de l'influence de la concentration de la solution d'iode :

Nous avons vu que, dans certains cas, l'adjonction à l'iode du mélange substrat-urine, était suivie de l'apparition d'une coloration violette très fugace. Dans ce cas, l'urine semble capable de fixer elle-même l'iode. C'est ce que nous avons voulu vérifier.

A quatre échantillons différents d'urine (10 ml) nous avons ajouté quelques gouttes d'amidon soluble. Nous avons ensuite versé, à l'aide d'une burette, une solution d'iode N/10. Dans tous les cas, nous avons noté le phénomène suivant : la première goutte d'iode provoque l'apparition d'une teinte bleue qui disparaît très rapidement. Au fur et à mesure de l'addition d'iode, cette teinte persiste de plus en plus longtemps, pour ne plus disparaître. C'est ce que nous avons considéré comme le terme du virage.

Quantité d'iode N/10 fixée par 10 ml d'urine.

Urine N° 1	0, 6 ml
Urine N° 2	1,15 ml
Urine N° 3	0, 8 ml
Urine N° 4	0, 6 ml

Nous avons recommencé ce titrage en utilisant de l'iode N/500 (concentration employée dans la méthode amyloclastique) et nous avons dû ajouter respectivement pour 1 ml d'urine, 3 ml, 4,9 ml, 3,8 ml,

2,5 ml de cette solution ; ce qui veut dire que, dans les conditions du titrage, la prise d'essai de 0,1 ml d'urine était capable de fixer 0,3, 0,49, 0,38 et 0,25 ml d'iode sur les 0,5 ml susceptibles d'entrer en réaction.

Devant ces résultats, nous avons essayé de pratiquer le dosage amyloclastique sur les mêmes urines, en employant des solutions d'iode plus concentrées.

	Solution d'iode utilisée	Amylasurie	Lecture du virage
Urine N° 1	Iode N/500	≠ 164 U	Après 5 min. la coloration disparaît très vite.
	Iode N/250	≠ 180 U	Virage incertain du rouge à l'orangé.
	Iode N/125	≠ 180 U	Virage incertain du rouge à l'orangé.
Urine N° 2	Iode N/500	?	Lecture impossible, la coloration disparaît immédiatement
	Iode N/250	180 U	Virage net.
	Iode N/125	180 U	Virage net.
Urine N° 3	Iode N/500	138 U	Virage net.
	Iode N/250	150 U	Virage très progressif
	Iode N/125	150 U	Virage très progressif du rouge à l'orangé.
Urine N° 4	Iode N/500	106 U	Virage net.
	Iode N/250	113 U	Virage du rouge à l'orangé.
	Iode N/125	113 U	Virage du rouge à l'orangé.

Les résultats obtenus sont assez contradictoires. Dans certains cas, l'augmentation de la concentration de la solution d'iode facilite la lecture du virage (urine N° 2), dans d'autres cas, elle la rend, au contraire, plus délicate (urines N° 3 et 4).

Deux phénomènes indépendants l'un de l'autre semblent entrer en jeu :

- la capacité de fixation d'iode de l'urine ;
- l'activité amyloclastique de l'urine.

L'influence combinée de ces deux actions fait que, dans certains cas, l'adjonction d'une quantité d'iode supplémentaire intensifie exagérément la coloration donnée avec l'empois d'amidon et rend malaisée la lecture du dosage ; dans d'autres, au contraire, elle permet de la faire aisément, l'iode étant, en grande partie, consommé d'emblée. C'est, en nous basant sur ces constatations, que nous préconiserons une modification de la méthode de SOMOGYI pour le dosage de l'amylase urinaire.

3° Etude de l'influence de la concentration saline de l'urine.

L'urine est un milieu dont la concentration saline est forte et extrêmement variable. Nous avons voulu déterminer dans quelles mesures, les sels étaient susceptibles d'intervenir dans le dosage.

— Dosage de l'amylase sur une urine diluée.

Urine	Titre en amylase	Lecture
Non diluée.	# 164 U	Disparition rapide de la coloration.
Diluée au 1/2 dans l'eau distillée.	# 102 (51 x 2)	Virage très progressif difficile à saisir. La coloration persiste.
Diluée au 1/2 dans le sérum physiologique.	# 102 (51 x 2)	Virage très progressif difficile à saisir. La coloration persiste.
Diluée au 2/3 dans l'eau distillée.	# 100 U	Virage progressif difficile à saisir.

La dilution de l'urine qui réduit la concentration saline, ne permet pas d'améliorer la netteté du virage. Les résultats obtenus sont assez différents mais il n'est pas possible d'y attacher une grande importance étant donné les difficultés d'appréciation du terme de la réaction.

— Dosage de l'amylase sur une urine dialysée.

Nous avons vu que les urines sont susceptibles de fixer des quantités d'iode différentes. Nous avons pensé éliminer les substances

responsables de cette fixation par la dialyse. Les dosages ont été effectués par les méthodes amyloclastique et saccharogénique (SOMOGYI). Deux échantillons ont été testés.

Dans les deux cas, la quantité mise à dialyser était de 50 ml. Les volumes recueillis ont été respectivement de 60 ml et de 55 ml. Les corrections, permettant de corriger cette dilution, ont été apportées.

	Avant dialyse	Après dialyse
Méthode saccharogénique de SOMOGYI		
Urine N° 1	208 U	208 U
Urine N° 2	159 U	167 U
Méthode amyloclastique		
Urine N° 1	≠ 208 U (virage difficile)	≠ 225 U (virage presque illisible)
Urine N° 2	167 U (virage net)	150 U virage net)

La dialyse ne modifie pas sensiblement les résultats trouvés ; par contre, elle ne facilite pas la lecture du virage. Si celui-ci est difficile à apprécier avant dialyse (urine N° 1), il le reste après dialyse. Les substances susceptibles de fixer de l'iode ne sont donc pas dialysables.

D. — PROPOSITION D'UNE MODIFICATION DE LA METHODE AMYLOCLASTIQUE POUR LE DOSAGE DE L'AMYLASE URINAIRE

Au cours des dosages que nous avons effectués par la méthode amyloclastique, nous avons remarqué que les urines en réaction se comportaient essentiellement de deux manières :

- celles qui après incubation avec l'amidon donnent avec la solution d'iode une coloration violette persistante ;
- celles qui après incubation avec l'amidon donnent avec la solution d'iode, une coloration violette fugace.

Nous basant sur cette constatation, nous avons tenté d'introduire une modification ayant pour but une meilleure appréciation du terme de la réaction.

Nous procédons de la manière suivante :

1° La décoloration du mélange iode-urine-amidon est très rapide.

On ajoute aussitôt après l'addition du mélange urine-susbrat, 0,5 ml supplémentaire de solution d'iode. La coloration violette persiste et la fin de la réaction se lit très aisément.

2° Le mélange iode-urine-amidon reste coloré.

Deux cas peuvent se produire :

a) Au fur et à mesure des additions, la coloration évolue normalement et le virage peut être lu aussi aisément que sur un sérum. Il n'y a pas lieu de modifier la technique.

b) La coloration évolue très progressivement en passant par des teintes intermédiaires, rendant très malaisée l'appréciation du virage.

Dans ce cas-là, on recommence le dosage, en introduisant seulement 0,3 ml d'iode dans les tubes à hémolyse. L'addition du mélange urine-amidon est suivie d'une coloration qui disparaît rapidement. On ajoute à nouveau 0,5 ml d'iode. La coloration persiste et les teintes sont suffisamment tranchées pour que la lecture du virage soit facile.

En procédant de cette manière, nous avons obtenu les résultats suivants sur plusieurs urines.

Méthode	Urine N° 1	Urine N° 2	Urine N° 3	Urine N° 4	Urine N° 5
Saccharogénique DORCHE et Coll.	216 U	311 U	316 U	266 U	237 U
Saccharogénique SOMOGYI.	179 U	343 U	306 U	167 U	209 U
Amyloclastique	180 U	400 U	400 U	150 U	200 U

Les urines 1 et 2 entraînaient une décoloration rapide du mélange iode-amidon, au contraire, avec les urines 3, 4 et 5 la coloration persistait et nous avons opéré initialement sur 0,3 ml d'iode.

Les résultats trouvés par la méthode amyloclastique sont assez proches de ceux de la méthode saccharogénique de SOMOGYI, sauf dans le cas de l'urine N° 3, où l'on note un chiffre sensiblement plus élevé.

La méthode amyloclastique de SOMOGYI, ainsi modifiée, pour le dosage de l'amylase urinaire, n'est pas entièrement satisfaisante du point de vue analytique. Son application nous paraît cependant intéressante, car du fait de sa simplicité de mise en œuvre et de sa rapidité d'exécution, elle permet, dans les cas d'urgence, d'obtenir très vite un résultat. Malgré les difficultés rencontrées dans la lecture du virage, ce résultat reste toujours suffisamment précis pour que l'on puisse sans équivoque différencier une urine normale d'une urine pathologique. La méthode amyloclastique modifiée dans les conditions décrites ci-dessus, nous paraît donc très bien adaptée au dosage d'urgence de l'amylase urinaire. Pour les dosages de routine, demandant une précision plus grande et où le facteur temps compte moins, nous préconiserons la méthode saccharogénique de SOMOGYI. Cette méthode qui permet de travailler en milieu tamponné, nous a toujours donné sur les urines des résultats extrêmement reproductibles.

CONCLUSIONS

Dans la première partie de ce travail consacré essentiellement à l'étude et à la mise au point de la technique amyloclastique de SOMOGYI, nous avons revu rapidement :

1° Les principaux caractères biochimiques des amylases et des amidons.

2° L'origine, la nature et le rôle de l'amylase sanguine et urinaire.

3° Les principales méthodes de dosages de l'amylase.

4° L'intérêt du dosage de l'amylase pour le diagnostic des affections du pancréas et des glandes salivaires.

Nous avons ensuite confronté les résultats donnés par plusieurs méthodes de dosages de l'amylase sur différents échantillons de sérums humains et animaux. Pour ceci, nous avons dû successivement :

1 - **Préparer des substrats** permettant à l'amylase d'exercer son action dans des conditions aussi reproductibles que possible. La lyophilisation d'une suspension d'amidon de maïs tamponné à pH 7 nous a donné de bons résultats.

2 - **Réaliser un sérum de référence.** Seul un mélange sérum humain - salive nous a permis d'obtenir une préparation donnant des résultats concordants pour les méthodes saccharogéniques et iodométriques. Il n'en est pas de même des sérums animaux.

3 - **Etudier différents facteurs** susceptibles d'intervenir dans le dosage de l'enzyme (température, pH, anticoagulants...).

Les méthodes retenues pour cette confrontation, outre la méthode amyloclastique de SOMOGYI, ont été :

- la méthode saccharogénique de SOMOGYI.
- la méthode saccharogénique de DORCHE et Coll
- la méthode iodométrique de SMITH et ROE.

Sur le sérum humain, ces méthodes conduisent à des résultats très voisins. Ceux donnés par la méthode de DORCHE sont environ 10 % plus bas, mais ceci est lié à la température d'incubation qui est de 37° au lieu de 40° pour la méthode de SOMOGYI

La méthode amyloclastique apparaît comme la plus avantageuse, car elle est beaucoup plus rapide d'exécution, tout en étant aussi précise et aussi reproductible.

L'application de la méthode amyloclastique au dosage de l'amyrase urinaire s'est révélée laborieuse. La lecture du virage, délicate et parfois impossible, a été améliorée par une modification de technique. Dans ces conditions, il est aisé de différencier rapidement une urine normale d'une urine renfermant une quantité pathologique d'amyrase.

Le Président de la Thèse :

Prof Dorche

VU, le Doyen :

Hautmeyer



VU et permis d'imprimer

LYON, le 3 mai 1965

BIBLIOGRAPHIE

1. AGNERAY J. — Bulletin d'information du Ministère de la Santé Publique et de la Population, 1962, **1**, 49.
2. APPLEBAUM I.P. — « Am. Inter. Med. », 1944, **21**, 35.
3. AVANTURIER. — Thèse Pharm., Lyon 1950.
4. BALTZER F. — « Klin. Woch. », 1939, **9**, 929.
5. BARATNENSKY, in GORIS A.L., LIOT A., JANOT M., GORIS A.N. — « Pharmacie Galénique », tome II, p. 1328. Masson Ed.
6. BARGER et FIELD. — « J. Chem. Soc. », London 1912, **101**, 1394.
7. BARGER et STARLING. — « J. Chem. Soc. », London 1915, **107**, 411.
8. BEIJERINCK. — « Proc. Akad. Wetensh. », 1912, **14**, 1107.
9. BEIJERINCK. — « Vergamelde Geschriften Delft », 1921, **5**, 21.
10. BERNARD A., LAMELIN P., DELATTRE. — « Presse Méd. », 1964, **72**, 509.
11. BOURQUELOT, in GORIS A.L., LIOT A., JANOT M., GORIS A.N. — « Pharmacie Galénique », tome II, p. 1328, Masson Ed., Paris 1949.
12. BROWN et MORRIS, in GORIS A.L., LIOTAT, JANOT M., GORIS A.N. — « Pharmacie Galénique », tome II, p. 1328, Masson Ed., Paris 1949.
13. CANDEL S. et WHEELOCK M.C. — « Am. Intern. Med. », 1946, **25**, 88.
14. CARAWAY W.T. — « Am. J. Clin. Path. », 1959, **32**, 97.
15. CHANEL Noël. — Dictionnaire Economique concernant divers moyens de conserver sa santé. Lyon 1732.
16. CHROMETZKA F. et ERLEMANN F. — « Klin. Woch. », 1938, 1673.
17. Mc CORKLE et GOLDMANN. — S.G.O., 1942, **74**, 439.
18. COURTOIS J. — Exposés annuels de Biochimie Médicale, 1947, **7**, 171.
19. COWIE J.M.G., FLEMING I.D., GREENWOOD C.T., MANNERS D.U. — « J. Chem. Soc. », 1957, 4430.
20. DORCHE, MATHIAN et AVANTURIER. — « Lyon Pharmaceutique », 1951, 139.
21. DORCHE J. et REVOL M.A. — « Bulletin des Travaux de la Société de Pharmacie de Lyon », tome III, **2**, 35.
22. DORCHE J., ROULLET M., DEBAT S. — « Lyon Pharmaceutique », 1951, **7**, 203.
23. DORCHE J. et LUX. — « Bulletin des Travaux de la Société de Pharmacie de Lyon », tome I, **89**, 1957.
24. DUMAZERT. — « Bull. Soc. Chim. Biol. », 1950, **32**, 998.
25. EFFRONT J. — Les catalyseurs biochimiques dans la vie et l'industrie. Dunod et Pinat ed., 1914.
26. FABIANI P., MAGDELAINE M., FROSSARD G.J., DALLORSO, LEGER L. — « Revue Internationale d'Hépatologie », 1963, **13**, 455.
27. FERRO P.V. — « Enza-Trol Manual », 1960, 13. Dade Reagents ed., Miami 1961.

28. FISCHER E.H., DUCKERT F., BERNFELD P. — « *Helv. Chim. Acta* », 1950, **33**, 1060.
29. FLEURY P., COURTOIS J.E. — *Fiches Techniques de Chimie Biologique Sang*, 32, 7^e supplément 1961. Vega Ed., Paris.
30. FOLIN et WU. — « *J. Biol. Chem.* », 1920, **41**, 367.
31. GAMBILL E., MASON H.L. — « *J. of Lab. and Clin. Med.* », 1964, **63**.
32. GEACHIN Mc. R.L., CLEASON et ADAMS. — « *Arch. of Biochem. and Bioph.* », 1958, **99**, 130.
33. GEACHIN Mc R.L. et LEWIS J.P. — « *J. Biol. Chem.* », 1959, **234**, 795.
34. GORIS A.L., LIOT A., JANOT M.M., GORIS A.N. — « *Pharmacie Galénique* », tome II. Masson Ed., Paris 1949.
35. GRIGNARD. — « *Traité de Chimie Organique* », tome VIII, n° 2. Masson Ed. Paris 1938.
36. GRAY, PROBSTEN, HEIFETZ. — « *J.A.M.A., Arch. Internat. Med.* », 1941, **67**, 805.
37. GULZOW. — « *Klin. Woch.* », 1943, 621.
38. GUY E.J., JENNERS R. — « *J. Dairy Sci.* », **37**, 644.
39. HESTRINS. — « *J. Biol. Chem.* », 1949, 179, 943.
40. HOBSON. — in « *Biochemist'.* ». Handbook Ed. Cyril Long, Londres 1961.
41. HOPKINS R.H., KULKA D. — « *Arch. Biochem. Biophys.* », 1957, **69**, 45.
42. HUGGINS C., RUSSEL P.S. — « *Ann. Surg.* », 1948, **128**, 668.
43. KIBRICK A.C., ROGERS H.E., SKUPPS S. — « *J. Biol. Chem.* », 1951, **190**, 107.
44. KIRCHOFF. — « *Schweiger's Journ. F. Chem. und. Phys.* » 1815, **14**, 389.
45. KITAHARA K., KURUSHIMA M. — « *J. Ferm. Technol.* », Japan 1952, **30**, 72.
46. KITAHARA K., KURUSHIMA M. — « *Chem. Abst.* », 1955, **49**, 10396.
47. KJELDAHL et GREEN, in GORIS A.L., LIOT A., JANOT M.M., GORIS A.N. — « *Pharmacie Galénique* », tome II, p. 1328. Masson Ed., Paris 1949.
48. KOSSMANN et KRAUCH, in GORIS A.L., LIOT A., JANOT M.M., GORIS A.N. — « *Pharmacie Galénique* », tome II, p. 1328, Masson Ed., Paris 1949.
49. LEULIER A. et REVOL L. — « *Précis de Pharmacie Chimique* », Maloine Ed. Paris 1948.
50. LEUWENHOEK. — « *Epistolae physiologicae super conpluribus naturae arcanus* ». Epist. XXVI, 1719.
51. LINTNER J. — « *Prakt. Chem.* », 1806, **34**, 378.
52. LOON VAN E.J., LIKINS M.R., SEGER A.J. — « *Am. J. Clin. Path.* », 1952, **22**, 1134.
53. MAGENDIE C.R. — « *Ac. Sc.* », 1846, **23**, 189.
54. MATSAMITSU, KAWAGUCHI, BECK J.E. — « *Clin. Chem.* », 1963, **9**, 496.
55. MAYER W. et FINKELSTEIN H. — « *Bull. of the Hopkins Hospital* », 1929, **45**, 1047.
56. METAIS P. — « *Monographie annuelle de la Société Française de Biologie Clinique-enzymologie* », 1964, p. 22.
57. MEYER, FREUDENBERG. — in « *Biochimie Médicale* », M. POLONOVSKI. Masson Ed., Paris 1948.

58. MEYER K.H., SPAHR P.F., FISCHER E.H. — « *Helv. Chim. Acta* », 1953, **36**, 1924.
59. MYERS et KILLIAN. — « *J. Biol. Chem.* », 1917, **29**, 179
60. OTTENSTEIN. — « *Biochem. Z.* », 1931, **240**, 350.
61. PAGET et DELAISSE. — « *Ann. Biol. Clin.* », 1958, **3-4**, 223.
62. PAGET et LIEFOOCHE. — « *Ann. Biol. Clin.* », 1961, janvier-février, 79.
63. PALLADIN et GOLDSTEIN. — « *Bull. Soc. Chim. Biol.* », numéro spécial, 4^e Congrès de Chimie Biologique, 1933, 404.
64. PAYEN et PERSOZ. — « *Ann. Chim. et Phys.* », 1833, **53**, 73.
65. PIMSTONE. — « *Clin. Chem.* », 1964, **10**, 891.
66. POLLOCK. — « *British Med. J.* », 1959.
67. POMERANZ. — « *Bioch. et Bioph. Acta.* », 1963, **73**, 105.
68. REIFF A.E., NABSETH D.C. — « *Clin. Chem.* », 1962, **2**, 112.
69. RICE E. — « *Clin. Chem.* », 1959, **5**, 92.
70. RICHTERICH. — « *Praxis* », 1961, 1160.
71. RITAMA Z. — « *Physiol. Chem.* », 1943, **278**, 17.
72. RODRIGUEZ OLLEROS. — « *Am. J. of Gast. Enter.* », mars 1955, 241.
73. ROE, SMITH, TREADWELL. — « *Appl. Physiol.* », 1952, **4**, 666.
74. RUBIN B.A., OBRUCHEVA N.V. — « *Doklady. Akad. Nauk SSSR* », 1954, **95**, 337.
75. SAX S.M., TRIMBLE. — « *Clin. Chem.* », 1963, **9**, 296.
76. SCHEIDT. — S. Lukes Hospital Milwaukee. Symposium Technicon, octobre 1964, Paris.
77. SCOZ GUZZI. — « *Klin. Woch.* », 1940, **19**, 1014.
78. SEDAILLAN, BERTOYE, GARIN et GAUTHIER. — « *J. Med. Lyon* », 1957, **38**, 143.
79. SMITH et ROE. — « *J. Biol. Chem.* », 1949, **179**, 53.
80. SOMOGYI M. — « *J. Biol. Chem.* », 1938, **124**, 179.
81. SOMOGYI M. — « *J. Biol. Chem.* », 1940, **134**, 301.
82. SOMOGYI M. — « *J. Biol. Chem.* », 1942, **142**, 679.
83. SOMOGYI M. — « *Clin. Chem.* », 1960, **6**, 23.
84. SUTRA M.R. — « *Bull. Soc. Chim.* », 1950, **17**, 294.
85. THAYER P.S. — « *J. Bact.* », 1953, **66**, 656.
86. TSUJISAKA Y., FUKUMOTO J., YAMAMOTO T. — « *Nature* », Lond. 1958, **181**, 770.
87. UJIHIRA I., SEARCY R.L., BERCK J.E., HAYASHI. — « *Clin. Chem.* », 1965, **11**, 97.
88. VINCENT D. et SEGONZAC G. — « *Ann. Biol. Clin.* », 1951, **9**, 359.
89. VINTILESCO I., IONESCO C.N., MANDROI V. — « *Bull. Soc. Chim. Biol.* », 1938, **20**, 953.
90. WENGER R.G. — « *Clin. Chem.* », 1954, **6**, 10.
91. WHELAN W.J., BAILEY J.M. — « *Biochem. J.* », 1954, **58**, 560.
92. WHELAN W.J., ROBERTS P.J.P. — « *Biochem. J.* », 1954, **58**, 569.
93. WILDING, COOKE, GADDIE. — « *Clin. Chem.* », 1963, **9**, 496.

94. WOHLGEMUTH. — « Biochem. Z. », 1908, **9**, 1.
 95. WOLFF et FERNBACH C.R. — « Ac. Sc. », 1905, **140**, 1403.
 96. YOUNG N.F. — « Proc. Soc. Exp. Biol. Med. », 1938, **32**, 538.
 97. YOUNG N.F. — « Standard Methods of Clinical Chemistry ». Vol. I, p. 8-10.
 98. ZIESE. — « Thèse Munich 1928 et in Methodik der Fermente », par C. Oppenheimer, 1929, 278.
 99. ZINKER E.P., REITHEL F.J. — « J. Lab. Clin. Med. », 1949, **34**, 1312.
 100. ZULKOWSKY. — « Ber. Z. », 1928, **13**, 1395.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
LES AMYLASES - GÉNÉRALITÉS	
Historique	15
Sources d'amylase	16
L'amidon - Les amylases - Rappels biochimiques ...	18
 L'AMYLASE SANGUINE ET URINAIRE	
Nature de l'amylase sérique	36
Origine de l'amylase sérique	37
Rôle de l'amylase sérique	38
L'amylase urinaire	39
Les méthodes de dosage de l'amylase	40
Le problème des unités	50
Intérêt du dosage de l'amylase en clinique - Variations normales et pathologiques	51
 DOSAGE DE L'AMYLASE SANGUINE ET URINAIRE	
Application de la méthode amyloclastique de SOMOGYI	
Introduction	60
Description des techniques utilisées	60
Préparation et choix des substrats	73
Essai de préparation d'un sérum de référence ...	87
Comparaison des résultats obtenus par les méthodes utilisées	92
Etude de la reproductibilité et de la précision des méthodes employées	97
Etude de l'influence de divers facteurs dans le dosage de l'amylase sérique	103
Essais de dosage de l'amylase urinaire par la méthode amyloclastique	111

